



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/62, 15/13, C07K 16/28, 16/46, C12P 21/08, C12N 5/12, C12M 1/00, G01N 33/53, A61K 39/395</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 <b>WO99/61629</b></p> <p>(43) 国際公開日 1999年12月2日(02.12.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/02711</p> <p>(22) 国際出願日 1999年5月24日(24.05.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/159957 1998年5月25日(25.05.98) JP 特願平10/163023 1998年5月26日(26.05.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 旭化成工業株式会社 (ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒530-8205 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号 Osaka, (JP) 旭メディカル株式会社 (ASAHI MEDICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒101-8482 東京都千代田区神田美土代町9-1 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 大野満春(ONO, Mitsuharu)[JP/JP] 〒416-0933 静岡県富士市中丸703-21 Shizuoka, (JP) 草加孝之(SOKA, Takayuki)[JP/JP] 〒416-0939 静岡県富士市川成島88-3 Shizuoka, (JP) 森本幾夫(MORIMOTO, Ikuo)[JP/JP] 〒156-0043 東京都世田谷区松原5-25-16 Tokyo, (JP)</p>		<p>宮村耕一(MIYAMURA, Koichi)[JP/JP] 〒462-0823 愛知県名古屋市中区東大曾根町上3丁目1020-2 Aichi, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 藤野清也(FUJINO, Seiya) 〒160-0004 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: <b>CELL SEPARATION DEVICE AND SEPARATION METHOD</b></p> <p>(54) 発明の名称 細胞の分離装置及び分離方法</p> <p>(57) Abstract A device for separating CD(cluster differentiation)-positive cells of human hematopoietic undifferentiated cells and a method for separating or detecting the same. In the above device and method, CD-positive cells are separated by using CD molecule-recognizing recombinant antibodies obtained by isolating antiCD4 or antiCD34 antibody gene and expressing the same. The device and method are efficaciously employed in the field of medicine for collecting hematopoietic undifferentiated cells, eliminating lymphocytes from cells to be used in bone marrow transplantation, detecting leukemic cells, etc. It is also possible to prepare medicinal compositions for autoimmune diseases by using the above antibodies.</p>		

ヒト造血未分化細胞のCD (Cluster differentiation)陽性細胞を分離する装置及び分離または検出する方法の提供。

抗CD4又はCD34抗体の遺伝子を単離し、発現させることにより得られるこれらのCD分子認識組換え抗体を用いてこれらのCD陽性細胞を分離する装置、及び分離または検出する方法。

造血未分化細胞の捕集、骨髓移植用細胞からのリンパ球の除去、白血病細胞の検出など医薬の分野において有効に利用される。また、この抗体を用いて自己免疫疾患用医薬組成物とすることもできる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦  
AL アルバニア  
AM アルメニア  
AT オーストリア  
AU オーストラリア  
AZ アゼルバイジャン  
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ  
BB バルバドス  
BE ベルギー  
BF ブルキナ・ファソ  
BG ブルガリア  
BJ ベナン  
BR ブラジル  
BY ベラルーシ  
CA カナダ  
CF 中央アフリカ  
CG コンゴ  
CH スイス  
CI コートジボアール  
CM カメルーン  
CN 中国  
CR コスタ・リカ  
CU キューバ  
CY キプロス  
CZ チェッコ  
DE ドイツ  
DK デンマーク

DM ドミニカ  
EE エストニア  
ES スペイン  
FI フィンランド  
FR フランス  
GA ガボン  
GB 英国  
GD グレナダ  
GE グルジア  
GH ガーナ  
GM ガンビア  
GN ギニア  
GW ギニア・ビサウ  
GR ギリシャ  
HR クロアチア  
HU ハンガリー  
ID インドネシア  
IE アイルランド  
IL イスラエル  
IN インド  
IS アイスランド  
IT イタリア  
JP 日本  
KE ケニア  
KG キルギスタン  
KP 北朝鮮  
KR 韓国

KZ カザフスタン  
LC セントルシア  
LI セリヒテンシュタイン  
LK スリ・ランカ  
LR リベリア  
LS レソト  
LT リトアニア  
LU ルクセンブルグ  
LV ラトヴィア  
MA モロッコ  
MC モナコ  
MD モルドヴァ  
MG マダガスカル  
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア  
共和国  
ML マリ  
MN モンゴル  
MR モーリタニア  
MW マラウイ  
MX メキシコ  
NE ニジェール  
NL オランダ  
NO ノールウェー  
NZ ニュー・ジーランド  
PL ポーランド  
PT ポルトガル  
RO ルーマニア

RU ロシア  
SD スーダン  
SE スウェーデン  
SG シンガポール  
SI スロヴェニア  
SK スロヴァキア  
SL シエラ・レオネ  
SN セネガル  
SZ スワジランド  
TG トーゴ  
TJ タジキスタン  
TZ タンザニア  
TM トルクメニスタン  
TR トルコ  
TT トリニダード・トバゴ  
UA ウクライナ  
UG ウガンダ  
US 米国  
UZ ウズベキスタン  
VN ヴィエトナム  
YU ユーゴスラヴィア  
ZA 南アフリカ共和国  
ZW ジンバブエ

## 明 細 書

## 細胞の分離装置及び分離方法

技術分野

本発明は、新規な組換え抗体を用いた細胞分離装置及びそれを利用した細胞分離あるいは細胞検出方法に関する。より具体的例示としてヒトCD (Cluster differentiation) 4 抗原またはCD34抗原に対する新規な組換え抗体を用いたヒトCD4 またはCD34陽性細胞の分離方法、検出方法及びこれらの細胞の分離装置に関する。

さらに本発明は、抗原の定量、検出、医薬品及び医療機器への応用に有用な、ヒトCD4 抗原に対して特に高い親和性と特異性をもつ抗体あるいはこの抗体を含む医薬組成物に関する。

背景技術

ヒト血液細胞の表面抗原に対する抗体を用いることで血液細胞群の中から特定の細胞だけ分離、除去、回収、検出することができる。例えばCD4 陽性細胞の除去は、自己免疫疾患患者の病状を改善し、CD34 陽性細胞の回収は、移植にも利用できる造血前駆細胞を濃縮しうる。

ヒトCD4 は分子量55kDの糖タンパク質で、モノマーとして細胞膜上に存在し、主としてT細胞に発現されている。CD4 を発現しているT細胞（末梢T細胞の約65%）はヘルパーT細胞としての性質をもち、クラスII MHC 分子によって提示された抗原を認識する。また、CD4 はHIV (human immunodeficiency virus : エイズウイルス) と結合し、感染の際に受容体として働くことも知られている。免疫系においてヘルパーT細胞は抗原に対して適切に応答するのに不可欠であり、B細胞のほとんどの抗体応答に必須のものである。ヘルパーT細胞は主として抗原提示細胞の表面に結合した非自己抗原を認識した場合活性化され、インターロイキン2 を分泌してT細胞の増殖を刺激してこれがB細胞の活性化を補助しており、さらには抗体の産生を促している。またリンパ球を補助するだけでなくマ

インターフェロンを分泌することによりマクロファージを活性化するヘルパーT細胞も存在する。

健常人では自己障害を防ぐために、自己反応性抗原受容体を持ったリンパ球クローンの除去 (clonal deletion)、それらの無反応性化 (clonal anergy)、その働きの抑制 (suppression) といった様々な機構を用意している (免疫寛容)。自己免疫疾患の発生に関するメカニズムはまだ十分には解明されていないが、このような免疫寛容機構の異常が自己免疫疾患の原因となると考えられている。自己反応性抗原受容体を持ったリンパ球クローンはCD4を発現しているヘルパーT細胞だけではないが、ヘルパーT細胞の自己免疫疾患における重要性は認識されている。

ある自己免疫疾患の治療方法としては、その症状の程度に応じて副腎皮質ホルモン剤の投与、脾臓の摘出、免疫抑制剤の投与などが適用される。しかしこうした薬物療法や摘脾手術を行なっても、効果的に回復しない症例も多く存在している。こうした患者に対する治療方法についても絶対的なものは確立されていないのが現状であり対策が急がれている。

自己免疫疾患の他の治療方法として、免疫吸着カラムを用いた血液の体外循環による自己抗体の吸着除去も種々試みられている。たとえば免疫グロブリンと結合性を有するプロテインAを担体に固定化したカラムの適用も検討されている。しかしプロテインAは高価であり、吸着特異性の点でもあまり優れず、さらには副作用の生じた症例も報告されており、こうした医療用機材に利用するには種々の問題点が残されている。

近年においては、液性因子の血液からの除去のみならず、血液細胞分離技術が報告されている。しかし、用いるリガンドによっては抗原との結合性が弱い、抗原との反応特異性が低いなどの問題により、十分な細胞除去を期待できない、あるいは目的以外の細胞が非特異的に吸着されるといった問題がある。

特開平 3-32680号公報にTリンパ球に親和性を有するペプチドまたは脂質を固



定化した分離材が、また、特開平6-154316号公報、特開平6-154317号公報、特開平6-218051号公報、特開平6-269663号公報にはCD4陽性細胞に親和性を有するペプチドを不織布に固定化したCD4陽性細胞捕集材がそれぞれ開示されているが、いずれもリガンドに用いているペプチドの抗原に対する親和性、特異性に問題があり、十分な細胞吸着能力を期待できない。特に後者は抗CD4抗体の抗原結合部位の形成に密接に関係している、相補性決定領域「CDR」とその間に介在する枠組領域「フレームワーク」の一部分のペプチドを用いており、一部分だけでは効果的な抗原結合は望めない。CDRには、H鎖とL鎖のそれぞれについて、N末端側から「CDR-1」「CDR-2」「CD-3」と呼ばれる3つの領域が存在することが知られており、少なくともH鎖あるいはL鎖の「CDR-1」「CDR-2」「CDR-3」の立体配置が抗体と実質的に同様に保たれていることが効果的な抗原結合を望む上で必須である。

従来ヒトCD34は、造血未分化細胞の細胞表面抗原として報告され、そのヒトCD34分子を認識する抗体の産生細胞として抗MY10抗体産生ハイブリドーマが知られてきた(USP 4965204、及びJ. Immunology誌、133 巻、157 頁、1984年)。その後、抗ヒトCD34抗体は多数報告され、また、骨髄移植などの医療分野において造血未分化細胞の分離などへの応用が図られている。こうした医療に向けた応用を有効に活用するため抗ヒトCD34抗体を効率よく生産し、それを利用した医療機器開発の必要が生じてきている。

CD34分子は、血液の未分化細胞上に発現する未分化細胞の抗原マーカーとして知られ、未分化細胞の分離への応用が報告されてきている(S. Saelandら、Blood 誌、72巻、1580頁、1988年など)。さらに、抗CD34抗体と、ビオチンやアビジン、または磁気ビーズとの組み合わせなどを利用し、未分化細胞を分化した細胞群および癌細胞から分離する医療機器の開発が行われつつある(Dregerら、ExpHematol. 誌、23巻、147 頁、1995年)。

抗体は、一般に抗原との結合性が強く、かつ特異性が高いことが知られ、医療

への利用が期待されている。しかし、医療機器作成に際し、抗体の製造に掛かる費用が問題となっている。抗体を効率よく生産し、医療機器への応用を行うことが必要である。そのため、抗体を効率よく生産する方法として、組換え抗体を作成する技術を確立し、それを医療機器へ応用することが期待される。

### 発明の開示

本発明はこれらの抗体が持つヒトCD4抗原に対しての高い親和性と特異性を保持したまま、遺伝子工学的手法によりヒトマウスキメラ抗体化、1本鎖抗体化などの改変を行い、抗原性の低下、並びに抗体生産量の向上、生産費用の低減を可能とした組換え抗体を提供することにある。

生体内に存在する通常の抗体は、抗原特異的な可変領域塩基配列及び定常領域遺伝子の2つが必要である。定常領域遺伝子には少数のクラスが知られるが、H鎖L鎖の可変領域塩基配列は極めて多様性が高く、目的とする可変領域塩基配列の取得は非常に労力を要する。しかしながら、本発明者らは、遺伝子増幅（PCR）、抗原を用いた酵素免疫測定法（EIA）やフローサイトメーターによる結合実験を駆使することにより、ハイブリドーマ中の複数の抗体遺伝子の中から目的であるヒトCD4抗体およびヒトCD34抗原に対する遺伝子を取得するに至り、次の通りその配列と機能を決定した。さらに、その遺伝子を組み換えてヒトマウスキメラ抗体、1本鎖抗体を大量に生産することを可能にした。

これらの組み換え抗体を利用することにより、従来マウスの腹水や細胞培養により得ていた抗体が、細菌等により生産できるようになり、低価格での医療機器の供給の可能性を生み出した。

モノクローナル抗体の作製は、通常目的の抗原を免疫した動物よりBリンパ球を分離し、ミエローマ細胞と融合することによりハイブリドーマを作製することに始まる。次に目的の抗原を用いたスクリーニングを行い、抗体産生ハイブリドーマを取得する。この際に抗原との結合性が強く、かつ特異性が高い抗体を産生するハイブリドーマを取得するためには数多くの細胞をスクリーニングしなければ

ばならず多大な労力を要する。

本発明者らが鋭意検討した結果、抗CD4抗体生産ハイブリドーマ4H5からとりだしたH鎖可変領域のCDR-1、CDR-2 および CDR-3がそれぞれ配列表配列番号1、2 および3に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域のCDR-1、CDR-2 および CDR-3がそれぞれ配列表配列番号4、5 および6に記載のアミノ酸配列である抗体がヒトCD4抗原に対して特に高い親和性と特異性をもつ抗体であることを見出した。

1例を例示すれば、抗ヒトCD4抗体として知られる OKT4A抗体のヒトCD4抗原に対する結合親和性は、 $KA = 4 \times 10^8 M^{-1}$ と報告されており(Virginia L. Pulito ら、The Journal of Immunology, 156 : 2840-2850 (1996))、故に解離定数(KD:この値が低いほど結合親和性は高い)は、 $KD = 2.5 \times 10^{-9} M$  ( $1/KA = KD$ より)。一方、本明細書中の実施例に記載の通り、4H5抗体のヒトCD4抗原に対する解離定数は、 $KD = 8.08 \times 10^{-10} M$  (実施例5)である。これは OKT4A抗体より4H5抗体の方がヒトCD4抗原に対してより強く結合しうることを示している。

4H5抗体を産生するハイブリドーマ、Mouse-Mouse hybridoma 4H5は、日本国通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に、受託番号:FERM BP-6729として寄託されている。

生体内に存在する通常の抗体は、抗原特異的な可変領域塩基配列及び定常領域遺伝子の2つが必要である。定常領域遺伝子には少数のクラスが知られるが、H鎖L鎖の可変領域塩基配列は極めて多様性が高く、目的とする可変領域塩基配列の取得は非常に労力を要する。しかしながら、遺伝子増幅(PCR)や抗原を用いた酵素免疫測定法(EIA)による結合実験を駆使することにより、ハイブリドーマ中の複数の抗体遺伝子の中から目的であるヒトCD4抗原に対する抗体遺伝子を取得するに至り、その遺伝子を組み換えてヒトマウスキメラ抗体、1本鎖抗体を大量に生産することを可能にした。

通常の抗体は大小2種類のポリペプチドからなり、その大きい方のサブユニッ

トを「H鎖」といい、小さい方のサブユニットを「L鎖」という。また、それぞれのペプチドはN末端側に存在して抗原結合部位を形成する「可変領域」（または「V領域」）と、抗体のクラス別に一定の「定常領域」（または「Fc」）からなっている。可変領域は、更に、特に抗原結合部位の形成に密接に関係している相補性決定領域「CDR」とその間に介在する枠組領域「フレームワーク」に分けられる。CDRには、H鎖とL鎖のそれぞれについて、N末端側から「CDR-1」「CDR-2」「CDR-3」と呼ばれる3つの領域が存在することが知られている。第1図にIgGの構造模式図を示す。

抗体の可変領域を構成するアミノ酸数は、抗体により異なることが多い。4H5抗体のH鎖の可変部位のアミノ酸配列は、配列表配列番号35に示した。配列表配列番号35のアミノ酸1位から30位はフレームワーク1、31位から35位はCDR-1、36位から49位はフレームワーク2、50位から66位はCDR-2、67位から98位はフレームワーク3、99位から107位はCDR-3、108位から118位はフレームワーク4を示す。4H5抗体のL鎖の可変部位のアミノ酸配列は、配列表配列番号36に示した。配列表配列番号36のアミノ酸1位から23位はフレームワーク1、24位から38位はCDR-1、39位から53位はフレームワーク2、54位から60位はCDR-2、61位から92位はフレームワーク3、93位から101位はCDR-3、102位から111位はフレームワーク4を示す。これらのフレームワークとCDRの境は、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edition, 1991 (USA NIH 発行)に掲載されたマウス抗体可変領域の遺伝子配列を参考にして決定した。

配列表配列番号7には、配列表配列番号35のアミノ酸9位から118位に相当する核酸塩基配列を示した。配列表配列番号8には、配列表配列番号36のアミノ酸9位から111位に相当する核酸塩基配列を示した。

抗CD34抗原に結合する抗体である抗MY10抗体のH鎖の可変部位の遺伝子配列およびそれがコードするアミノ酸配列を、配列表配列番号39に示す。配列表配列番号39のアミノ酸1位から30位はフレームワーク1、31位から35位はCDR-1、

36位から49位はフレームワーク 2、50位から65位は CDR-2、66位から97位はフレームワーク 3、98位から106 位は CDR-3、107 位から117 位はフレームワーク 4を示す。

また、MY10抗体のL鎖の可変部位の遺伝子配列およびそれがコードするアミノ酸配列を、配列表配列番号40に示す。配列表配列番号40のアミノ酸1位から23位はフレームワーク 1、24位から39位は CDR-1、40位から54位はフレームワーク 2、55位から61位は CDR-2、62位から93位はフレームワーク 3、94位から102 位はCDR-3、103 位から113 位はフレームワーク 4を示す。

1 本鎖抗体の遺伝子配列およびそれがコードするアミノ酸配列を、配列表配列番号41に示す。配列表配列番号41のアミノ酸配列1位から39位は大腸菌から分泌用シグナルを含む配列、40位から156 位はH鎖の可変領域、157 位から171 位はリンカー、172 位から284 位はL鎖の可変領域、285 位から302 位まではE-tagを含む配列を示す。

pCANTAB5E プラスミド（ファルマシア社）は、リンカーとしてH鎖L鎖の一部を含む配列つまり140 位から169 位が用意されており、本発明ではその配列を利用した。

H鎖及びL鎖と結合するリンカーは、本発明におけるプラスミドに含まれるが、このような配列に限定されずに利用することができる。ハイブリドーマから1本鎖抗体を単離する方法は、Recombinant Phage Antibody System キット（ファルマシア社）などを利用することが可能な場合もあるが、本発明のようにスクリーニングに必要なヒトCD34抗原が無い場合、キットを有効に使用できず多くの工夫を要する。

本発明は、次の細胞分離装置及びこれを使用する細胞の分離方法、あるいは検出方法に関する。

(1) CD4分子に結合するキメラ抗体、1本鎖抗体、またはそれらを組み合わせた抗体を用いたCD4陽性細胞分離装置。

(2) H鎖可変領域の CDR-1が Asp Tyr Val Ile Asn (配列表配列番号1)、 CDR-2が Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ala Tyr Tyr Asn Glu Met Phe Lys Gly (配列表配列番号2)、 CDR-3が Arg Gly Thr Gly Thr Gly Phe Ala Tyr (配列表配列番号3) で表されるアミノ酸配列であり、L鎖可変領域の CDR-1が Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn (配列表配列番号4)、 CDR-2 が Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser (配列表配列番号5)、 CDR-3 が Gln Gln Ser Ser Glu Asp Pro Pro Thr (配列表配列番号6) で表されるアミノ酸配列であり、Fc領域がヒト型であるキメラ抗体を用いたCD4陽性細胞分離装置。

(3) H鎖可変領域の CDR-1が Asp Tyr Val Ile Asn (配列表配列番号1)、 CDR-2が Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ala Tyr Tyr Asn Glu Met Phe Lys Gly (配列表配列番号2)、 CDR-3が Arg Gly Thr Gly Thr Gly Phe Ala Tyr (配列表配列番号3) で表されるアミノ酸配列であり、L鎖可変領域の CDR-1が Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn (配列表配列番号4)、 CDR-2 が Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser (配列表配列番号5)、 CDR-3 が Gln Gln Ser Ser Glu Asp Pro Pro Thr (配列表配列番号6) で表されるアミノ酸配列である1本鎖抗体を用いたCD4陽性細胞分離装置。

(4) CD4分子に結合するキメラ抗体、1本鎖抗体、またはそれらを組み合わせた抗体を用いたヒトCD4陽性細胞の分離または検出方法。

(5) H鎖可変領域の CDR-1が Asp Tyr Val Ile Asn (配列表配列番号1)、 CDR-2が Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ala Tyr Tyr Asn Glu Met Phe Lys Gly (配列表配列番号2)、 CDR-3が Arg Gly Thr Gly Thr Gly Phe Ala Tyr (配列表配列番号3) で表されるアミノ酸配列であり、L鎖可変領域の CDR-1が Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn (配列表配列番号4)、 CDR-2 が Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser (配列表配列番号5)、 CDR-3 が Gln Gln Ser Ser Glu Asp Pro Pro Thr (配列表配列番号6) で表されるアミノ

酸配列であり、Fc 領域がヒト型であるキメラ抗体を用いたヒトCD4陽性細胞の分離または検出方法。

(6) H鎖可変領域の CDR-1が Asp Tyr Val Ile Asn (配列表配列番号1)、CDR-2が Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ala Tyr Tyr Asn Glu Met Phe Lys Gly (配列表配列番号2)、CDR-3が Arg Gly Thr Gly Thr Gly Phe Ala Tyr (配列表配列番号3) で表されるアミノ酸配列であり、L鎖可変領域の CDR-1が Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn (配列表配列番号4)、CDR-2 が Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser (配列表配列番号5)、CDR-3 が Gln Gln Ser Ser Glu Asp Pro Pro Thr (配列表配列番号6) で表れるアミノ酸配列を含有する1本鎖抗体を用いたヒトCD4陽性細胞の分離または検出方法。

また、本発明は、次の細胞分離装置及びこれを使用する細胞の分離方法あるいは検出方法に関する。

(1) CD34分子に結合するキメラ抗体、1本鎖抗体、またはそれらを組合せた抗体を用いたCD34陽性細胞分離装置。

(2) H鎖可変領域の CDR-1が Ser-His-Gly-Val-His (配列表配列番号43)、CDR-2 が Val-Ile-Trp-Gly-Ala-Gly-Arg-Thr-Asp-Tyr-Asn-Ala-Ala-Phe-Ile-Ser (配列表配列番号44)、CDR-3 が Asn-Arg-Tyr-Glu-Ser-Tyr-Phe-Asp-Tyr (配列表配列番号45) で表されるアミノ酸配列であり、L鎖可変領域の CDR-1が Arg-Ser-Ser-Gln-Asn-Leu-Val-His-Ser-Asn-Gly-Asn-Thr-Tyr-Leu-His (配列表配列番号46)、CDR-2 が Lys-Val-Ser-Asn-Arg-Phe-Ser-Gly-Val-Pro-Asp-Arg-Phe (配列表配列番号47)、CDR-3 が Ser-Gln-Ser-Thr-His-Val-Pro-Leu-Thr (配列表配列番号48) で表されるアミノ酸配列であり、Fc 領域がヒト型である抗体を用いたCD34陽性細胞分離装置。

(3) H鎖可変領域の CDR-1が Ser-His-Gly-Val-His (配列表配列番号43)、CDR-2 が Val-Ile-Trp-Gly-Ala-Gly-Arg-Thr-Asp-Tyr-Asn-Ala-Ala-Phe-Ile-Ser (

配列表配列番号44)、CDR-3 が Asn-Arg-Tyr-Glu-Ser-Tyr-Phe-Asp-Tyr (配列表配列番号45) で表されるアミノ酸配列であり、L鎖可変領域の CDR-1が Arg-Ser-Ser-Gln-Asn-Leu-Val-His-Ser-Asn-Gly-Asn-Thr-Tyr-Leu-His (配列表配列番号46)、CDR-2 が Lys-Val-Ser-Asn-Arg-Phe-Ser-Gly-Val-Pro-Asp-Arg-Phe (配列表配列番号47)、CDR-3 が Ser-Gln-Ser-Thr-His-Val-Pro-Leu-Thr (配列表配列番号48) で表されるアミノ酸配列である 1 本鎖抗体を用いた C D 34陽性細胞分離装置。

(4) 抗体のアミノ酸配列の C 末端、N 末端またはそれらの両者に、塩基性アミノ酸または酸性アミノ酸を含むアミノ酸配列を付加した抗体を用いた前記 (1)～(3) のいずれかの C D 34陽性細胞分離装置。

(5) C D 34分子に結合するキメラ抗体、1 本鎖抗体、またはそれらを組合せた抗体を用いたヒト C D 34陽性細胞の分離または検出方法。

(6) H鎖可変領域の CDR-1が Ser-His-Gly-Val-His (配列表配列番号43)、CD R-2 が Val-Ile-Trp-Gly-Ala-Gly-Arg-Thr-Asp-Tyr-Asn-Ala-Ala-Phe-Ile-Ser (配列表配列番号44)、CDR-3 が Asn-Arg-Tyr-Glu-Ser-Tyr-Phe-Asp-Tyr (配列表配列番号45) で表されるアミノ酸配列であり、L鎖可変領域の CDR-1が Arg-Ser-Ser-Gln-Asn-Leu-Val-His-Ser-Asn-Gly-Asn-Thr-Tyr-Leu-His (配列表配列番号46)、CDR-2 が Lys-Val-Ser-Asn-Arg-Phe-Ser-Gly-Val-Pro-Asp-Arg-Phe (配列表配列番号47)、CDR-3 が Ser-Gln-Ser-Thr-His-Val-Pro-Leu-Thr (配列表配列番号48) で表されるアミノ酸配列であり、F c 領域がヒト型である抗体を用いたヒト C D 34陽性細胞の分離または検出方法。

(7) H鎖可変領域の CDR-1が Ser-His-Gly-Val-His (配列表配列番号43)、CD R-2 が Val-Ile-Trp-Gly-Ala-Gly-Arg-Thr-Asp-Tyr-Asn-Ala-Ala-Phe-Ile-Ser (配列表配列番号44)、CDR-3 が Asn-Arg-Tyr-Glu-Ser-Tyr-Phe-Asp-Tyr (配列表配列番号45) で表されるアミノ酸配列であり、L鎖可変領域の CDR-1が Arg-Ser-Ser-Gln-Asn-Leu-Val-His-Ser-Asn-Gly-Asn-Thr-Tyr-Leu-His (配列表配列番号



46)、CDR-2 が Lys-Val-Ser-Asn-Arg-Phe-Ser-Gly-Val-Pro-Asp-Arg-Phe (配列表配列番号47)、CDR-3 が Ser-Gln-Ser-Thr-His-Val-Pro-Leu-Thr (配列表配列番号48) で表されるアミノ酸配列を含有する 1 本鎖抗体を用いたヒト CD34陽性細胞の分離または検出方法。

(8) 抗体のアミノ酸配列のC末端、N末端またはそれらの両者に、塩基性アミノ酸または酸性アミノ酸を含むアミノ酸配列を付加して用いた前記(5)～(7)のいずれかのヒト CD34陽性細胞の分離または検出方法。

さらに本発明は、次の抗体、抗体をコードする核酸、この核酸を用いる抗体の生産方法、この抗体よりなる医薬組成物に関する。

(1) H鎖可変領域のCDR-1、CDR-2および CDR-3がそれぞれ配列表配列番号 1、2 および 3 に記載のアミノ酸配列であり、CD4抗原に対して親和性を有する抗体。

(2) L鎖可変領域のCDR-1、CDR-2および CDR-3がそれぞれ配列表配列番号 4、5 および 6 に記載のアミノ酸配列であり、CD4抗原に対して親和性を有する抗体。

(3) 受託番号がFERM BP-6729であるハイブリドーマ4H5 により産生される、CD4 抗原に対するモノクローナル抗体。

(4) 前記(1) から(3) のいずれかに記載の抗体をコードする核酸。

(5) 配列表配列番号 7 および 8 に記載の塩基配列を含有する、前記(4) に記載の核酸。

(6) 前記(4) または(5) に記載の核酸を用いた抗体の生産方法。

(7) 前記(6) の方法によって得ることができ、CD4 抗原に対して親和性を有する組換え抗体。

(8) 抗体のFc領域がヒト型である前記(7) に記載の組換え抗体。

(9) 抗体が 1 本鎖抗体である前記(7) に記載の組換え抗体。

(10) 前記(1) から(3) のいずれかに記載の抗体と、医薬的に許容しうる担体とからなる医薬組成物。

(11) 前記(7) から(9) のいずれかに記載の組換え抗体と、医薬的に許容しうる

担体とからなる医薬組成物。

本発明でいう「抗体」とは、通常生体内に存在する形の抗体の他に、抗体のH鎖もしくはL鎖の可変領域もしくはその組み合わせで形成される抗原結合部位を少なくとも1つ含む分子を含む。例えば、H鎖の可変領域のみ含むペプチド、1組のH鎖断片とL鎖断片からなるFab、2組のH鎖断片とL鎖断片からなる(Fab')<sub>2</sub>、H鎖断片とL鎖断片が同一ペプチド上に直列に結合した1本鎖抗体「ScFv」なども含まれる。

本発明でいう「ヒトCD4抗原」とは、Parnes, J.R. によりに報告(Adv. Immunology誌、44巻、265頁、1989年)され、リンパ球上に発現するヘルパーT細胞の抗原マーカーとして知られている。またCD4抗原はヒトでは他に単球、マクロファージなどにも発現されている。

抗体の抗原特異性と抗原への結合の強さが、主にCDRのアミノ酸配列によって決定されることはマウス抗体のヒト化で示されている(Gussow, D. and Seemann, G., Methods in Enzymology, 203:99-121 (1991); Glaser, S.M. et al., J. Immunology 149:2607-2614 (1992))。

COS7細胞による抗体の分泌発現には、種々のベクターが使用可能であるが(Whittle, N. and Adair, J. et al. (1987), Protein Eng., 1 (6), 499-505.; Sutter, K.D. and Feys, V. et al. (1992), Gene 113, 223-30.)、ヒト抗体の発現プラスミド(pG1)を利用し、ヒト・マウスキメラ抗ヒトCD4抗体を発現し得るプラスミドpG14H5、及びヒトCD34抗体を発現し得るプラスミドpG1My10を作成した。これをCOS7細胞へ遺伝子導入し、ヒト抗CD4抗体の生産を行える。ここで言う、ヒト・マウスキメラ抗体とは、可変領域がハイブリドーマ由来のマウス遺伝子配列であり、定常領域がヒト由来の遺伝子配列から構成される遺伝子によって生産された抗体を示す。pG1は、国際公開公報W095/15393に記載のpSEプラスミドのヒトCγ1の配列に付加された膜通過ドメイン(TM)を除去して、通常の抗体の様に生体内に分泌される様改良したプラスミドである。その作成の詳細

細は、参考例 1 として示してある。つまり、ヒト定常領域をコードする遺伝子配列を有しており、マウス可変領域遺伝子をつなぐことにより、ヒトマウスキメラ抗体を発現しうるプラスミドである。

本発明でいう「キメラ抗体」とは、異なる動物種の抗体のアミノ酸配列を人為的に組み合わせた抗体を示す。例えば、マウスハイブリドーマ由来の C D R を含み、定常領域にヒト抗体由来アミノ酸配列を含む抗体を示す。さらに、フレームワークにヒト由来のアミノ酸配列を含めることもできる。

本発明でいう「ヒト C D 34 抗原」とは、Civin らによりに報告 (USP-4965204、及び J. Immunology 誌、133 巻、157 頁、1984 年) され、血液の未分化細胞上に発現する造血未分化細胞の抗原マーカーとして知られている。

本発明でいう「実質的に同じ機能」とは、抗原分子上のエпитープ、抗原との結合力が実質上同じであることをいう。可変領域のフレームワークや定常領域におけるアミノ酸置換があったとしても、しばしば本質的に同じ性能の抗体を生成することが知られている。抗体の抗原特異性と抗原への結合の強さが、主に C D R のアミノ酸配列によって決定されることはマウス抗体のヒト化で示されている (Gussow, D. and Seemann, G., Methods in Enzymology, 203:99-121(1991); Glaser, S. M. et al., J. Immunology 149:2607-2614(1992))。

COS7 細胞は通常 10% ウシ胎児血清 (FBS) 加 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM 培地) を用い、5 % CO<sub>2</sub> 存在下 37°C で培養する。COS7 細胞への遺伝子導入法や、遺伝子導入後の細胞の育種生産法は、バイオマニュアルシリーズ 4 遺伝子導入と発現・解析法; 横田 崇、新井 賢一 羊土社 (1994) 等の実験書に記載されている。COS7 細胞への遺伝子導入法は、電気穿孔法その他、DEAE デキストラン法 (Bebbington, C. R. (1991); METHODS: A Companion to Methods in Enzymology, 2 (2), 136-45.) であっても良い。

本発明では、pG1 に組み込まれた定常領域遺伝子が C $\gamma$ 1 であるため、各クローンは IgG1 として発現した。抗体の生産時には、血清由来のウシ抗体の混入を避

けるために、無血清のDMEM培地によって培養することが望ましい。こうして培養上清中に分泌された抗CD4抗体は、例えばプロテインAやプロテインGを用いる一般的なIgG抗体の精製法によって容易に精製することができる。

工業生産の場合の宿主としてはCHO細胞、ミエローマSp2/0細胞がよく知られている(Xiang, J. et al. (1990) Mol. Immun., 27, 809; Bebbington, C.R. et al. (1992) Bio/technology, 10, 169; Larrick, J.W. and Wallace, E.F. et al. (1992) Immunol. Rev. 130, 69-85.; Deyev, S.M. and Lieber, A. et al. (1994) Appl. Biochem. Biotechnol. 47 (2-3), 143-54.)。例えばCHO細胞では、MTX等の薬剤により生産性の高いクローンを選択する方法も報告されており(Bebbington, C.R. (1991) METHODS: A Companion to Methods in Enzymology, 2 (2), 136-45.)、安定な高生産株が取得できれば、その株を組換え抗ヒトCD4抗体の工業的生産に利用できる。

ヒトマウスキメラ抗体は、医薬品として利用した場合、ヒト体内での抗原性がマウス抗体に較べ極度に低下しており、より安全性が向上している。通常の抗体をペプシンなどのプロテアーゼで分解したF(ab')<sub>2</sub>化した場合でもヒトFcを利用した断片は、マウスのものに較べ安全性が高い。また、医療機器への応用に際しても、リガンドとして利用されている抗体がプロテアーゼ等の分解を受け微量に遊離してくる可能性があるが、そうした分解産物に関してもヒト化されたものは、安全性が高いといえる。

1本鎖抗体においては、低分子化することにより抗原性を低下させ得る効果が期待される。抗体をパパインなどのプロテアーゼ処理しFab化した抗体は、マウスの定常領域を依然として含むが、1本鎖抗体はそれらを除いたものであり、抗原性が非常に低くすることができ得る。ハイブリドーマから1本鎖抗体を単離する方法は、Recombinant Phage Antibody Systemキット(ファルマシア社)などを利用することが可能な場合もあるが、生産宿主となる大腸菌にとって該1本鎖抗体が毒性を持ち、大腸菌の死滅、該1本鎖抗体の分解を起こすような場合には、

キットを有効に使用できず多くの工夫を要する。1本鎖抗体は、pSE380プラスミド（インビトロジェン社）やpET24d(+)プラスミド（ノバジェン社）などの誘導性のベクターと宿主となる菌種を検討することにより、調製し得る。また、生産においては、上述の方法の他、真核細胞発現系、昆虫細胞発現系、酵母細胞発現系も有効に利用しうる。H鎖及びL鎖を結合するリンカーは、(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)×3回繰り返しの15残基のアミノ酸を使用した。本配列に限定されず利用することができる。

本発明で生産した抗体を利用し、CD4陽性細胞の分離を行うことができる。本発明により、体外において血液細胞懸濁液から、もしくは体外循環により血液から効率よくCD4陽性細胞を分離することが可能となり、分離した細胞もしくはCD4陽性細胞を除去した細胞群は、種々の疾患の治療に用いうる。CD4陽性細胞を除去した細胞混合液、血液製剤の作成、もしくはCD4陽性細胞を主たる成分とした細胞懸濁液；CD4陽性細胞製剤の作成を容易に行うことができる。CD4陽性細胞除去により自己免疫疾患である慢性関節リウマチ、多発性硬化症、全身性エリテマトーデスなどの症状の改善が期待される。

抗体の形状として、生産抗体分子をそのまま利用することも可能であるが、各種プロテアーゼ処理により得られる抗原結合部位を含む断片であるFab、F(ab')<sub>2</sub>、FvあるいはFdなども適用することができる。これらの断片については、「抗体工学入門」（地人書館）などに説明がされている。その他にも本発明をヒト体内の血液の体外循環に応用する場合には抗体が血液中に遊離した際の副作用、抗原性などを考慮して可変領域以外の部分をヒト型抗体にするようなキメラ抗体を用いることも有用である。これら抗体の作製方法は特に限定されるものではないが、高純度に精製されたものを用いなければならない。モノクローナル抗体の生産方法は、通常行なわれているハイブリドーマをマウスの腹腔で増殖させ腹水から生産された抗体を回収する方法、もしくは、無血清培地による培養上清から得る方法でよい。断片ペプチドの場合には抗体分子の酵素処理により得ることができる。

が、遺伝子工学的な手法により細菌、酵母などに産生させることも可能である。これらの方法により得たモノクローナル抗体、モノクローナル抗体由来抗体断片、ペプチド等を組み合わせることにより、より強固な結合性を生じる。

現在、細胞の分離方法として、抗体を利用して特異的に目的の細胞だけを分離する方法が開発されつつある。例えば、蛍光抗体標識細胞分離法、水不溶性担体に目的細胞と親和性を有するリガンドを固定化しこれに目的細胞を直接的または間接的に結合させる方法、免疫吸着カラムによる分離および免疫磁気ビーズによる分離法などがある。

蛍光抗体標識細胞分離法は、最初に細胞混合液を目的とする細胞に発現されている膜抗原を認識する蛍光標識したモノクローナル抗体とインキュベートした後、処理した細胞にセルソーターなどでレーザー光を照射することにより抗体が結合した細胞のみが蛍光を発することを応用して、蛍光抗体が結合した細胞を分離する方法である。

目的細胞の膜表面に存在する抗原に対するモノクローナル抗体を直接分離装置表面に固定化して用いる方法、および最初に細胞混合液を目的細胞上の膜抗原に結合するモノクローナル抗体とインキュベートして、それから細胞表面上の抗体に結合する抗イムノグロブリン抗体のようなリガンドを固定化した細胞分離装置で処理される方法が国際公開公報W087-04628に記載されている。細胞分離は担体または装置に固定化されたモノクローナル抗体に対して、該抗原陽性細胞が直接もしくは、間接的に結合することで行なわれる細胞分離方法である。これらの方法は、抗体を固定化したプラスチックシャーレ上で分離されるもので、細胞混合液は最初抗体を固定化したプラスチックシャーレ上に注がれ、抗体と目的細胞上の膜抗原とを結合させるためにインキュベートされる。インキュベート後プラスチックシャーレを洗浄して結合していない細胞を除去して分離する。免疫吸着カラム法は目的細胞上の膜抗原に対する抗体などのリガンドをビーズ表面に固定化しこれをカラムに充填して細胞分離を行なうものである。

目的細胞上の膜抗原に対する抗体をビオチン標識したものを細胞混合液中に加えて、インキュベートすることにより細胞-抗体-ビオチン結合を形成させた後、多孔質アクリルアミドゲルにアビジンを固定化したビーズを充填したカラムを通過させビオチン-アビジンの強力な結合を利用して目的細胞をカラム内に結合させて分離する方法が国際公開公報W091-16116に記載されている。

免疫磁気ビーズ法は最初に細胞混合液を抗体の結合した磁気ビーズとインキュベートすることにより目的細胞を磁気ビーズで標識する。標識後磁気装置を用いて標識されていない細胞から標識細胞を分離する。

しかし、これらの方法により細胞分離を実行するためには多量の抗体分子を必要とし、特に医療現場への応用に際してはそのコストが問題となる。本発明により生産される組換え抗体によりそのコストを容易に下げることができる。

同じ細胞を認識する2種類または、2種類以上の抗体を直接固定化する担体の一つとして、水不溶性の担体を利用できる。CD4分子と、その他のCD4陽性細胞に発現する分子、例えばGタンパク共役型レセプターで、HIV感染のセカンドレセプターとして働く、Fusin (CXCR-4) (Feng, Y ら、Science、272 (5263) 巻、872-877, 1996年) や、同じく HIV感染のセカンドレセプターとして働く、CCR-5 (Deng, H ら、Nature、381 (6584) 巻、661-666, 1996年) 等と組合せも可能である。これらの分子は発現頻度が少なく、分離効率が悪いが、CD4分子を認識する抗体と同時にこれらの分子を認識する抗体を組み合わせることにより、これらの発現細胞を単離しうる。

同様にこれらの同じ細胞上の異なる抗原分子を認識する2種類または2種類以上の抗体を直接固定化した担体を利用することもできる。CD34分子と、その他の未分化細胞に発現する分子、例えばSCFのリセプターであるc-kit (Yarden ら、EMBO J.、6巻、3341頁、1987年)、リセプター FLK-2 (Mathews ら、Cell誌、65巻、1143頁、1991年)、インターロイキン-3 リセプター  $\alpha$  鎖 (Kitamura ら、Cell誌、66巻、1165頁、1991年) 等との組合せも可能である。これらの分子も

非常に発現頻度が少なく、分離効率が悪いが、CD 3 4 分子と同時に抗体を組み合わせることにより、これらの発現細胞を単離しうる。

例えば、あらかじめ細胞に固定化させる抗体にビオチンや、磁気ビーズを結合させておき、次にそのビオチンや磁気ビーズと結合しやすい物質、例えばアビジンや磁気を結合または含む水不溶性担体と反応させることにより、容易に細胞が結合した水不溶性担体を回収することができる。また、目的の造血未分化細胞にCD 3 4 抗体を反応させておき、抗イムノグロブリン抗体を結合した水不溶性担体と反応させ、水不溶性担体を洗浄または回収することで選択的に目的の細胞だけを分離することができる。水不溶性担体である磁気ビーズに固定化した抗体を利用すれば、磁石等により分離を効率化することもできる。本発明に用いられる容器形状として、水不溶性担体を充填したカラム、フラスコ状あるいは、フラスコ状ケースに水不溶性担体を充填したものが例示される。これらの容器形状とこれらの抗体を直接または、間接的に固定化した不溶性担体との組み合わせにより造血未分化細胞の分離器を作成しうる。また、これらの分離器は、細胞懸濁液や、生理食塩水などを流すポンプと組み合わせることにより、細胞分離システムとして利用性の高いものにすることができる。

本発明に用いられる容器形状として、水不溶性担体を充填したカラム、フラスコ状あるいは、フラスコ状ケースに水不溶性担体を充填したものが例示される。これらの容器形状とこれらの抗体を直接または、間接的に固定化した不溶性担体との組み合わせによりCD 4 陽性細胞の分離器を作製しうる。また、これらの分離器は、細胞懸濁液や、生理食塩水などを流すポンプと組み合わせることにより、細胞分離システムとして利用性の高いものにすることができる。

抗体を水不溶性担体に固定化する際に、抗体と水不溶性担体との間にスペーサーを介して結合することも有用である。更に、必要に応じて水不溶性担体と化合物を任意の長さの分子（スペーサー）を介して結合させてもよい。スペーサーの詳細に関しては、例えば、「アフィニティクロマトグラフィー」（笠井猷一ら、



東京化学同人出版、1991年、105～108頁）を参照することができる。スペーサーの例として、ポリメチレン鎖及びポリエチレングリコール鎖等が挙げられる。スペーサーの長さは500Å以下であることが好ましく、200Å以下であることが更に好ましい。スペーサーを介して水不溶性担体に化合物を結合させる方法としては、例えば、水不溶性担体としてアガロースを用いる場合、アガロースの水酸基とスペーサーとして用いるヘキサメチレンジイソシアナートの片側のイソシアナート基を反応、結合させ、残ったイソシアナート基と抗体のアミノ基、水酸基又はカルボキシル基等を反応、結合させる方法等が挙げられる。

本発明でいう水不溶性担体とは、常温の水溶液中で固形状態にあるものをいい、いずれの形状であってもよい。形状を例示すると球状、立方状、平面状、チップ状、繊維状、平膜状、スポンジ状、中空糸状のものなどが挙げられる。これらの内、細密充填のしやすさ、抗体を比較的均質に表面に保持しやすい点、実有効面積を比較的多く確保できる点、及び細胞懸濁液の流通面から、球状、粒状及び繊維状のものが望ましい。

水不溶担体の材質は、表面に抗体を保持できるものであれば、無機化合物、有機化合物を問わないが、細胞懸濁液との接触時に溶出物が少ないこと、形状の制御がより容易なことから有機高分子化合物が望ましい。このような例として、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリメタクリレートエステル、ポリアクリレートエステル、ポリアクリル酸、ポリビニルアルコール等のビニル系化合物あるいはその誘導体の重合体及び共重合体、ナイロン6あるいは66等のポリアミド系化合物、ポリエチレンテレフタレート等のポリエステル系化合物、セルロース等の植物由来の多糖類系化合物等が挙げられる。また、これらと磁石を組み合わせ、これらの水不溶性担体の回収を容易にすることもできる。

水不溶性担体を修飾し、表面に親水性を付与することも本発明に好適に用いられる。アルブミン、グロブリン等の生体由来タンパク質を固定化することや、合成官能基を導入することによって、水不溶性担体表面に親水性を付与しうる。親

水性を付与する合成官能基の例を示すと、繰り返し単位が2から1500のポリエチレングリコール鎖、水酸基、アミド基、エーテル基、エステル基がそれに該当する。但し、ポリエチレングリコール鎖と水酸基は結合していても、別に存在しても良い。親水性を付与するポリエチレングリコール鎖を有するモノマーの例を挙げると、メトキシジエチレングリコールメタクリレート、メトキシトリエチレングリコールメタクリレート等の末端メトキシメタクリレート、メトキシジエチレングリコールアクリレート、メトキシトリエチレングリコールアクリレート等の末端メトシアクリレート、及びメチル基の代わりに水素が結合した末端水酸基を有するメタクリレート及びアクリレート、また末端に1つ以上の重合性の官能基を有する繰り返し単位が2～1500のポリエチレングリコール鎖を有するモノマー全般をさす。更に、担体に直接結合させる場合、繰り返し単位2～1500のポリエチレングリコール誘導体も含まれる。親水性を与えるその他の置換基を有するモノマーの例を示すと、ビニルピロリドン等が挙げられるがこれに限定されるものではない。更に重合性官能基は1つ以上幾つ存在しても良い。重合性の官能基とは、単独または2つ以上の官能基によって重合できる官能基を指し、例を挙げるとビニル基、アセチレン基、ジエン基等の炭素多重結合、エポキシ基、オキセタン基等の環構造、等が挙げられるがこれに限定されるものではない。

更に、上記官能基と共に非イオン性官能基が存在しても良くその例を挙げると、非イオン性官能基で特に親水性の向上を目的にしたジメチルアミド基、ジエチルアミド基、ジイソプロピルアミド基等のアミド基、ポリエチレンテレフタレート鎖、ポリブチレンテレフタレート鎖等の芳香族ポリエステル鎖及び脂肪族ポリエステル鎖等のポリエステル鎖、メチレングリコール鎖、プロピレングリコール等のポリエーテル鎖、ポリカーボネート鎖、等の非イオン性親水性官能基、または、疎水性付与を目的としたアルキル鎖、弗化アルキル鎖、アリル鎖等の非イオン性官能基全般を含む。以上の何れの官能基が共存しても良いが、好ましくは、非イオン性親水性官能基を有する場合が良好である。

水不溶性担体を修飾し、表面に親水性を付与する方法として、共有結合、イオン結合、放射線やプラズマによるグラフト法、物理吸着、包埋あるいは基材表面への沈澱不溶化等あらゆる公知の方法を用いることもできる。従って、高分子化合物やその単量体を放射線或いはプラズマ等を用いてグラフト重合したり、共有結合するなどの公知の方法により表面改質（特開平1-249063号公報、特開平3-502094号公報）を施す方法は本発明に好適に用いられる。

水不溶性担体表面に抗体を固定化する方法には、化学的あるいは放射線や電子線を用いてのグラフト法によって水不溶性担体表面に抗体を共有結合する方法、あるいは、化学的方法により水不溶性担体表面の官能基を介して共有結合する方法などがある。この中で官能基を介しての共有結合方法が使用時の抗体の溶出の危険性が無く好ましい。水不溶性担体が被覆層を有する場合は、その被覆層表面に不溶化することもできる。

水不溶性担体、あるいはその被覆層表面に抗体固定化のための活性基を得る方法の一例としてハロゲン化シアン法、エピクロロヒドリン法、ビスエポキシド法、ブromoアセチルブロミド法、ハロゲン化アセトアミド法等がある。具体的には、アミノ基、カルボキシル基、ヒドロキシル基、チオール基、酸無水化物、サクシニルイミド基、置換性ハロゲン基、アルデヒド基、エポキシ基、トレシル基などが挙げられる。抗体固定化のしやすさとして、ブromシアン法、N-ヒドロサクシニイミド基法、ハロゲン化アセトアミド法が特に望ましい。

活性基に用いるハロアセトアミノメチル化剤としては、N-ヒドロキシメチルクロロアセトアミド、N-ヒドロキシメチルフルオロアセトアミド、N-ヒドロキシメチルブromoアセトアミド、N-ヒドロキシメチルヨードアセトアミド等が良好に用いられる。中でも、経済性及び安定性の面から好ましくは、N-ヒドロキシメチルブromoアセトアミド、N-ヒドロキシメチルヨードアセトアミド、等が良好に用いられる。水不溶性担体に導入されたフルオロ基、クロロ基は活性基導入後に、ヨウ化カリウム或いは臭化カリウムの溶液で処理することで容易にヨウ素基或いは

臭素基に変換できる。これらの活性基を導入した水不溶性担体の製造に用いられる酸触媒としては、強酸特にプロトン酸であれば何れのものでもよいが、敢えて例を挙げるとトリフルオロメタン、メタン、ベンゼン、トルエン等のスルホン酸誘導体及び硫酸、塩化亜鉛、塩化アルミニウム、四塩化スズ等のフリーデル・クラフツ触媒等が良好に用いられる。

本発明の遺伝子によって生産させた抗体に毒素を結合させ、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、全身性エリテマトーデスなどの患者に投与し、自己反応性抗原受容体を持ったCD4陽性リンパ球クローンを低減させ得る。また、こうした修飾抗体は、アフエーシスにより回収した患者の末梢血、および末梢血白血球懸濁液にも利用し得る。また、他の抗体由来の可変領域の遺伝子を組み合わせることにより、バイスペシフィック抗体、マルチスペシフィック抗体の生産も可能となる。

さらに本発明は、上記記載の本発明のモノクローナル抗体と医薬的に許容しうる担体とからなる医薬組成物を提供する。

こうして得られた本発明の抗CD4抗体遺伝子は、効率的に抗CD4抗体を生産することを可能とし、種々の形態の治療用製剤を提供する。こうして生産された組換え抗体は、例えば医薬的に許容しうる成分組成の担体や安定化剤など人体への投与に際し、該抗体の活性を保持させるために使用される物質とともに医薬用組成物中に含まれていてもよい。このような担体や安定剤としては、ヒト血清アルブミン、ゼラチン等を例示することができる。医薬的に許容しうるとは、悪心、目眩、吐き気等投与に伴う望ましくない副作用、頻回投与時の製剤に対する免疫応答などが起きないことを意味する。また、医薬的に許容しうる適当な溶剤や希釈剤、安定化剤とともに溶解された液状の医薬用組成物でもよい。さらに上記の医薬組成物に加えて生体内における濃度調節を目的とするミクロスフィア、リポゾーム等の徐放移植体を含む医薬用組成物であってもよい。

本発明において非経口（注射）する場合は、キメラ抗体及び1本鎖抗体で10 $\mu$

g ~1mg/体重kg程度が適当である。また、体外で細胞を処理する場合は、0.1  $\mu$ g ~1mg/ml程度が適当である。

他の抗体由来の可変領域の遺伝子を組み合わせることにより、バイスペシフィック抗体、マルチスペシフィック抗体の生産も可能となる。マルチスペシフィックとは、異なる抗原もしくはエピトープを認識する抗原結合部位を少なくとも2種類以上有する抗体を示す。中でもバイスペシフィックとは、異なる抗原もしくはエピトープを認識する抗原結合部位を2種類以上有する抗体を示す。例えば、通常の抗体の一方の抗原結合部位がCD4抗原もしくはCD34抗原を認識し、もう一方の抗原結合部位をTリンパ球抗原CD3等に対するバイスペシフィック化したものは、CD4陽性Tリンパ球もしくはCD34陽性白血病細胞にリンパ球をより強く認識することが可能であり白血病細胞などの除去効果を誘導し得る。CD3以外にも、汎リンパ球マーカー例えばCD2, CD5, CD6, CD7などが利用し得る。これらを組み合わせてIgMとして発現させれば、バイスペシフィック、マルチスペシフィックの抗体を作成し得る。こうした生産時にバイスペシフィック化する以外に、モノクローナル抗体を生産、精製し、その後に抗体同士を結合させ、バイスペシフィック化、マルチスペシフィック化することができる。

1本鎖抗体の場合において、生産時でのバイスペシフィック化、マルチスペシフィック化が可能であり、1ペプチド内に複数の抗原認識部位の組み合わせのH鎖L鎖を繰り返して並べることにより生産させることができる。生産、精製後に結合させることもできる。

これらは、異なる抗原に対してのみならず、同一分子内の異なるエピトープ、例えば異なる抗CD4抗体を組み合わせることも可能である。抗CD4抗体は、いくつか報告されている。例えばLeu-3a抗体、Leu-3b抗体（ベクトンデッキンソン社）、OKT4抗体、OKT4A抗体（オーソ社）、T4抗体（コールター社）、MT310抗体（ダコ社）、F101-69抗体、16P25抗体（バイオシス社）、Edu-2抗体、MEM-115抗体（シンバスバイオテクノロジー社）、7E14抗体（エクサルフィアコー

ポレーション社)、BL4 抗体、13B8.2抗体(イムノテック社)、KT69-7抗体(ラ  
ブビジョンコーポレーション社)、B-F51 抗体(プロゲンバイオテクニク社)  
、BL-TH4抗体(サンバイオBV社)、94B1抗体、L197抗体、L80 抗体、L93 抗体、  
L201抗体、L34 抗体、L202抗体、L200抗体、L252抗体、73F11 抗体、72G4抗体、  
NUTH1 抗体、L71 抗体、RFT4抗体、MT151 抗体、MT321 抗体(D.G. Healey ら、  
Eur. J. Immunol. 誌、21巻、1491頁、1991年)、OKT4B 抗体、OKT4C 抗体、OKT4  
D 抗体、OKT4E 抗体、OKT4F 抗体、Q6D3抗体、L77 抗体、L104抗体、L83 抗体、  
L190抗体、L122抗体、L120抗体(Matthias Merckenschlager ら、The J. Immunol.  
誌、145巻、2839頁、1990年)などが知られ、これらの抗体遺伝子を単離し、生  
産に用いることができる。

同様にこれらは、異なる抗原に対してのみならず、同一分子内の異なるエピト  
ープ、例えば異なる抗CD34抗体を組み合わせることも可能である。抗CD34抗  
体は、いくつか報告されている。例えば抗HPCA-2抗体(ベクトンデッキンソン社  
)、抗HPCA-1抗体(ベクトンデッキンソン社)、4A1(ニチレイ社)、B1.3C5 (Ka  
tzら、Leuk. Res. 誌、9巻、191頁、1985年)、12.8、115.2(Andrews ら、Bloo  
d 誌、67巻、842頁、1986年)、1CH3(Watt ら、Leukaemia 誌、1巻、417頁、  
1987年)、Tuk3 (Unchanska-Ziegler ら、Tissue Antigens、33巻、230頁、19  
89年)、QBEND10(Finaら、Blood、75巻、2417頁、1990年)、CD34(Ab-1)(Oncog  
ene Sciences社)、Immu-133(Barrande ら、Hybridoma 誌、12巻、203頁、1993  
年)などが知られ、これらの抗体遺伝子を単離し、生産に用いることができる。

H鎖及びL鎖の組み合わせによらず、H鎖のみもしくはL鎖のみのペプチドを  
利用することもできる。こうした抗体種の選択は、利用する用途により行うこと  
ができ、結合強度、抗原性等で選択し得る。

1本鎖抗体のアミノ酸配列は、配列表配列番号9および配列表配列番号10に示  
した。また、それをコードする核酸配列の例をアミノ酸配列と共に示した。配列  
表配列番号9のアミノ酸配列1位から22位は大腸菌から分泌用シグナルを含む配

列、23位から 133位はL鎖の可変領域、134位から 148位はリンカー、149位から 266位はH鎖の可変領域、267位から 305位まではFLAG-tag(270位から 277位)、c-myc-tag (281位から 290位)、His×6-tag (296位から 301位)を含む配列を示す。配列表配列番号10のアミノ酸配列1位から22位は大腸菌から分泌用シグナルを含む配列、23位から 140位はH鎖の可変領域、141位から 155位はリンカー、156位から 266位はL鎖の可変領域、267位から 305位まではFLAG-tag(270位から 277位)、c-myc-tag (281位から 290位)、His×6-tag (296位から 301位)を含む配列を示す。

配列表配列番号9および配列表配列番号10に記載のアミノ酸配列1位から20位を欠失させ、大腸菌菌体内に1本鎖抗体を発現することも可能である。また、配列表配列番号9および配列番号10に記載のアミノ酸配列267位から305位までは、1本鎖抗体の検出および精製のための配列であり、欠失あるいは如何なる配列にも置換し得る。大腸菌からの分泌シグナル及び検出、精製のための配列を含むベクターの作製は参考例2として示した。配列表配列番号9のアミノ酸配列134位から148位および配列表配列番号10のアミノ酸配列141位から155位のリンカーは、L鎖およびH鎖の可変領域の立体構造を実質的に4H5抗体と同等に保持できるものであれば、如何なる配列にも置換し得る。配列表配列番号9および配列表配列番号10に記載のアミノ酸配列305位のLys残基は水不溶性の担体に固定化する場合に1本鎖抗体分子の方向性を揃えるなど、有効に働くが、より固定化効率を上げるためにLys残基を複数導入することもできる。また、Cys残基を導入することも有効である。上述のような改変は遺伝子工学的手法により容易に実施しうる。

本発明の実施によれば、発現プラスミドpG1に組み込まれた定常領域遺伝子がC $\gamma$ 1であるため、各クローンはIgG1として発現する。抗体の生産時には、血清由来のウシ抗体の混入を避けるために、無血清のDMEM培地によって培養することが望ましい。こうして培養上清中に分泌された抗CD34抗体は、例えばブ

ロテインAやプロテインGを用いる一般的なIgG抗体の精製法によって容易に精製することができる。工業生産の場合の宿主としてはCHO細胞、ミエローマSp2/0細胞がよく知られている(Xiang, J. et al. (1990) Mol. Immun., 27, 809; Bebbington, C.R. et al. (1992) Bio/technology, 10, 169; Larrick, J.W. and Wallace, E.F. et al. (1992) Immunol. Rev. 130, 69-85.; Deyev, S.M. and Lieber, A. et al. (1994) Appl. Biochem. Biotechnol. 47(2-3), 143-54.)。

例えばCHO細胞では、MTX等の薬剤により生産性の高いクローンを選択する方法も報告されており(Bebbington, C.R. (1991) METHODS: A Companion to Methods in Enzymology, 2(2), 136-45.)、安定な高生産株が取得できれば、その株を組換え抗ヒトCD34抗体の工業的生産に利用できる。

抗体の形状として、生産抗体分子をそのまま利用することも可能であるが、各種プロテアーゼ処理により得られる抗原結合部位を含む断片であるFab、F(ab')<sub>2</sub>、FvあるいはFdなども適用することができる。これらの断片については、「抗体工学入門」(金光著、p20-22、地人書館)などに説明がされている。その他にも本発明をヒト体内の血液を体外循環に応用する場合には抗体が血液中に遊離した際の副作用、抗原性などを考慮して可変領域以外の部分をヒト型抗体にするようなキメラ抗体を用いることも有用である。これら抗体の作製方法は特に限定されるものではないが、高純度に精製されたものを用いなければならない。モノクローナル抗体の生産方法は、通常行なわれているハイブリドーマをマウスの腹腔で増殖させ腹水から生産された抗体を回収する方法、もしくは、無血清培地で培養した培養上清から得る方法でよい。断片ペプチドの場合には抗体分子の酵素処理により得ることができるが、遺伝子工学的な手法により細菌、酵母などに産生させることも可能である。これらの方法により得たモノクローナル抗体、モノクローナル抗体由来抗体断片、ペプチド等を組み合わせることにより、より強固な結合性を生じる。

CD34分子は、Civinらによりに報告(USP-4965204、及びJ. Immunology誌、



133 巻、157 頁、1984年) され、血液の未分化細胞上に特異的に発現する未分化細胞の抗原マーカーとして知られている。この抗原マーカーを利用し、未分化細胞を分離する試みが報告されてきている(S. Saelandら、Blood 誌、72巻、1580頁、1988年など)。さらに、抗CD34抗体と、ビオチンやアビジン、または磁気ビーズとを組み合わせ、未分化細胞を分化した細胞群および癌細胞から分離する医療機器の開発が行われつつある(Dregerら、ExpHematol. 誌、23巻、147頁、1995年)。

本発明で分離される造血未分化細胞(CD34陽性細胞)とは、特定の刺激により増殖可能な細胞であり、赤血球、単球、顆粒球、リンパ球、マクロファージなどの成熟した細胞群を1種類以上に分化しうる細胞を示している。特に、半固形培地にて適当な増殖因子存在下で培養した場合、コロニーを形成する未分化な血液細胞及び、全ての系列への分化能と自己増殖能を有する造血幹細胞を含む。その細胞は、骨髓や臍帯血に豊富に含まれている。また、その細胞は、末梢血中にも含まれるが、顆粒球コロニー形成因子(G-CSF)などのサイトカインを投与することで、末梢血中に誘導することもできる。また、これらの細胞を培養することにより、造血未分化細胞を体外で増殖させる技術も報告されつつある。これらの造血未分化細胞を含む、細胞懸濁液は、本発明により造血未分化細胞を分離する材料となりうる。

本発明の細胞分離装置を医療機器として利用し、造血未分化細胞の分離を行うことができる。体外において血液細胞懸濁液から、もしくは体外循環により血液から効率よく造血未分化細胞を分離でき、分離した細胞は種々の疾患の治療に用いることが可能となる。

血液のようにさまざまな細胞種を含む溶液から、必要とする造血未分化細胞を単離または濃縮し、もしくは必要としない細胞を除去することは、医療効果を高める上で有効な手段である。骨髓移植とは、骨髓破壊した白血病患者などの癌患者、再生不良性貧血など先天性免疫疾患の患者に対し、正常な造血未分化細胞を

移植する方法であり、これらの患者に対する有効な治療法の一つとして定着しつつある。最近では、造血未分化細胞は骨髓からだけでなく、末梢血や臍帯血から得る方法が用いられる。同種骨髓移植は、白血球型であるHLA型がほぼ一致した健常人から回収した骨髓液を、抗癌剤または、放射線で骨髓破壊した患者へ輸注する方法であるが、その問題点として、拒絶反応であるGVHD（移植片体宿主病）を引き起こすことである。そのため、近年造血系の悪性腫瘍、癌の治療において行なわれる自家骨髓移植療法、または、同種骨髓移植法の結果引き起こされる移植片対宿主病(GVHD)予防のために、造血未分化細胞の分離の需要が高まってきている。

本発明の一つの特徴は、組み換え抗体を利用していることであるが、組み換え抗体を利用することで、不溶性担体へ固定化しやすい抗体に改変することができる。抗体を構成しているペプチドのC末端、もしくはN末端にアミノ酸配列を付加することで、不溶性担体等の基材に効率よく固定しうる。

ヒトマウスキメラ抗体の場合、H鎖、L鎖のC末端、N末端、またはその組み合わせで本来の抗体の有していなかった配列として、塩基性または酸性のアミノ酸を含む配列を付加することである。Fc部分の途中で配列を、遺伝子的に改変し、塩基性または酸性アミノ酸にする場合も、改変した部分を含めたC末端側は、付加したアミノ酸配列と見なすことができる。ヒトマウスキメラ抗体に限らず、Fc部分を不溶性担体に結合しやすくすることは、分離器等を作成するに適している。

1本鎖抗体において、ペプチドのC末端またはN末端に基材への固定用配列を付加することは望ましい。

付加する配列に含まれるアミノ酸として、塩基性アミノ酸、酸性アミノ酸を含む配列が望ましいが、基材への固定化を目的とするものであれば本発明に含まれる。

塩基性アミノ酸として、リシン、ヒドロキシリシン、アルギニン、ヒスチジン

等が挙げられる。酸性アミノ酸として、アスパラギン酸、グルタミン酸等が挙げられる。特に、リシン、グルタミン酸、アスパラギン酸を利用することは、より効率的である。

配列の長さは、特に限定されるものでないが、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸などの1アミノ酸を付加することであっても有効である。しかし、これらのアミノ酸を複数個含めた配列を付加することは、より効果的である。1本鎖抗体の様に、分子量の小さな抗体に付加した場合、ある程度長い配列を付加することで、基材との固定後に抗体が抗原と結合する際の立体障害が少なくなり、分離器としての効果がより期待される。

本配列に付加した抗体は、検出するための色素等を結合しやすくするため、抗原と結合した抗体を検出することで、抗原を検出測定することが可能となる。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、IgGの構造を模式的に示す。

第2図は、プラスミドpG1の概略図である。

第3図は、プラスミドpSE380ScFvの概略図である。

第4図は、プラスミドpET24ScFvの概略図である。

第5図は、4H5抗体とMT310抗体の抗原結合親和性を示した図であり、使用した抗体濃度とELISAでの定量値(ABS)との相関で表した。

第6図は、キメラ抗体のKG 1a細胞への結合性を示す。

(1)は、マウスCD34抗体を反応させたポジティブコントロール。

(2)は組換え抗体がCD34陽性細胞であるKG 1a細胞を染色しうることを示している。黒ピークは、ネガティブコントロールである白ピークに対し染色されたことを示している。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施例を説明するが、これら実施例は具体例により本発明を更に説明するものであって、本発明を限定するものではない。

## 〔参考例 1〕

pG1 プラスミドの調製を行った。膜結合型ヒト抗体の発現ベクターpSE(国際公開公報W095/15393)の膜貫通領域(TM)を除去し、ヒト抗体を分泌発現可能なベクターを作製した。まず発現ベクターpSEを制限酵素SalIで消化後、切断末端を平滑化した。この反応は、DNA Blunting Kit(宝酒造社)を用い、添付のプロトコールに従って操作した。以上の処理を行った発現ベクターpSEを制限酵素ApaIで消化後、0.7%アガロースゲルにて電気泳動し、C $\gamma$ 1 遺伝子及び膜貫通領域(TM)を含む遺伝子領域が欠失したpSEベクターDNAを抽出精製した。この反応はGeneClean II Kit(Bio 101 社)を用い、添付のプロトコールに従って操作した。抽出したpSEベクターの制限酵素切断末端は、ウシアルカリフォスファターゼ(宝酒造社)により、自己環化が起きないように処理した。次に、ヒトC $\gamma$ 1 遺伝子の全長が組み込まれたプラスミドDNA pUCCG1を制限酵素KpnI(宝酒造社)で消化し、切断末端を平滑末端化した後、制限酵素ApaIで消化した。この反応物を0.7%アガロースゲルにて電気泳動し、C $\gamma$ 1 遺伝子の全長を含むDNA断片を抽出精製した。このDNA断片と、先の処理を行ったpSEベクターをライゲーションキットVer.2(宝酒造社)を用いて連結し、連結反応産物を大腸菌DH5株へ導入した。出現したコロニーから数個を選んで培養し、常法に従ってプラスミドDNAを抽出精製した。pSEベクターに存在する適当な制限酵素を用いてこれらプラスミドの切断パターンを調べ、予想されたパターンに一致したものを選び出した。以上の操作によって得られたプラスミドをpG1とした。第2図にpG1プラスミドの図を示した。

## 〔参考例 2〕

1 本鎖抗体(ScFv抗体)を産生するベクターは、抗CD4抗体遺伝子を導入する前にあらかじめ大腸菌からの分泌シグナル、及び精製、検出用のtagをコードする配列を含むプラスミドの作成を行った。大腸菌からの分泌シグナル(PelBタンパク質のシグナル配列)の取得は、配列表配列番号21(5' TCATGAAATACCTGCTGC

CGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCGGCCAG 3')及び配列番号22 (5' TCGGGCCGCAGC CATGGTGT'TTTCGGGCCATCGCCGGCTGGGCCGCGAGGAGCAGCA 3')の2種を等量混合し、94℃ 5分、熱変性後65℃にて5分アニールさせ、72℃10分、GeneAmp PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase (宝酒造社)を用い、ポリメラーゼにより伸長反応を行った。この断片をTA cloning kit(インビトロジェン社)を使用し、クローニングした。これにより大腸菌からの分泌シグナルをコードするcDNAを取得した。

精製、検出用のtag をコードする配列の取得は、配列表配列番号23 (5' TCGGGC CGCAGACTACAAGGATGACGATGACAAAGGCTCGAGCGAGCAGAAGCTGA 3')及び配列番号24 (5' GGTGGGTCGACCTCGAGCCCAGATCCTCTTCGCTGATCAGCTTCTGCTCGCTCGAGC 3')の2種を等量混合し、94℃ 5分、熱変性後60℃にて5分アニールさせ、72℃10分、GeneAmp PCR Reagent Kit with Ampli Taq DNA Polymerase(宝酒造社)を用い、ポリメラーゼにより伸長反応を行った。この反応後のサンプルをテンプレートとして、さらに以下に示すプライマーを用いてPCR 反応を行い、増幅された断片をTA cloni ng kit (インビトロジェン社)を使用し、クローニングした。これにより精製、検出用のtag をコードするcDNAを取得した。使用したプライマーは配列表配列番号25 (5' TCGGGCCGCAGACTACAAGGATG 3') 及び配列番号26 (5' TAAGCTTATCATTTGGTC GA CCCGTGGTGATGATGATGGTGGGTCGACCTCGAGCC 3')を使用した。PCR 条件はGeneAm p PCR Reag ent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase(宝酒造社)を用い、94℃ 1分、62℃ 1分、72℃ 1分を1サイクルとして、18サイクル行った。PCR装置は、型名DNA Thermal Cycl er 480 (パーキンエルマー社)を使用した。クローニングした遺伝子を、大腸菌からの分泌シグナルをコードするcDNAは、制限酵素BspHI (New England Biolabs社) 及びNotI (宝酒造社)で消化し、精製、検出用のtag をコードするcDNAは、制限酵素HindIII(宝酒造社) 及びNotI (宝酒造社)で消化した後、3.5%アガロースゲルにて電気泳動し各々のDNA 断片を切り出し抽出した。アガロースゲルからの DNA断片の抽出には、PCRprep(プロメガ社)を用いて

行った。

pET24d(+) プラスミド (ノバジェン社) は予め、マルチクローニングサイト中の制限酵素NotIサイトから制限酵素Bpu1102Iサイト間の除去を行った。制限酵素NotI (宝酒造社) 及び制限酵素Bpu1102I (宝酒造社) を用いてpET24d(+) プラスミドを消化し、Klenow fragment (New England Biolabs社) とdNTP mixture (宝酒造社) を用いて添付のプロトコールに従い平滑末端化した。このプラスミド DNA断片を1%アガロースゲルにて電気泳動し、切り出し抽出した。これを自己環化させることによって、制限酵素サイトの除去を行ったpET24d(+) プラスミドを取得した。自己環化は、ライゲーションVer. 2キット (宝酒造社) を使用した。またアガロースゲルからの DNA断片の抽出には、GeneCleanII Kit (Bio 101社) を用い行った。

pSE380プラスミド (インビトロジェン社) または上記の制限酵素サイトの除去を行ったpET24d(+) プラスミドを制限酵素NcoI (宝酒造社) 及びHindIII (宝酒造社) で消化し、0.8%アガロースゲルにて電気泳動し、ベクター DNA断片を抽出精製した。前述の制限酵素消化した大腸菌からの分泌シグナルをコードするcDNA及び、精製、検出用のtag をコードするcDNAをこのベクター断片と連結した。各々のライゲーションは、ライゲーションVer. 2キット (宝酒造社) を使用した。またアガロースゲルからの DNA断片の抽出には、GeneCleanII Kit (Bio 101社) を用い行った。

以上の操作により作製したScFv抗体産生用プラスミドベクターをpSE380ScFv及びpET24ScFv とした。第3図、第4図にそれぞれの概略図を示した。

#### 〔実施例1〕

種々の抗体とヒトCD4との結合親和性を評価するため、ヒト可溶性CD4の生産と精製を行った。健常人より末梢血15mlを採取し、ハンクスバランسد生理食塩水 (ギブコ社) で30mlとし、フィコールパック (ファルマシア社) を10mlずつ分注した遠沈管2本に静かに13mlずつ重層し、800回転/分、20分の条件にて

分離し、単核細胞層の細胞を回収した。回収した細胞をハンス液で洗浄した。この細胞  $1 \times 10^7$  個から mRNA を QuickPrep mRNA Purification Kit (ファルマシア社) を使用し、添付の説明書に従って単離した。得られた mRNA を鋳型として、1st strand cDNA を合成した。これは、cDNA Synthesis Kit (ファルマシア社) を使用し、添付の説明書に従って行った。その後、PCR法により、目的の遺伝子の開始コドンから膜貫通領域 (TM) の前まで増幅および 5' 末端側に HindIII サイトの付加、3' 末端側に FLAG-tag 配列、ストップコドン、NotI サイトの付加を行った。使用したプライマーは配列表配列番号 11 (5' AAGCTTATGAACCGGGGAGTCCCTTTTA 3') および配列番号 12 (5' GCGGCCGCTCACTTGTCTCGTCCTTGTAGTCTGGCTGCACCGGGGTGGACCA 3') である。

PCR 条件は GeneAmp PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase (宝酒造社) を用い、94°C 1 分、57°C 1 分、72°C 2 分を 1 サイクルとして、30 サイクル行った。PCR 装置は、型名 DNA Thermal Cycler 480 (パーキンエルマー社) を使用した。増幅された遺伝子断片は、TA cloning kit (インビトロジェン社) を使用し、クローニングした。塩基配列の決定は DNA シークエンサー Ver. 1. 2. 0, Model 373A (Applied Biosystems 社) を用い、メーカーのプロトコールに従って行った。標識反応は、Universal M13 Reverse primer (インビトロジェン社) または Universal M13 Forward primer (インビトロジェン社) をプライマーとして、PRISM Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社) を用い、方法は添付のプロトコールに従った。染色は、ABI 社のラベリングキットを利用した。得られた遺伝子配列の確認後、真核細胞発現ベクターである pcDNA3 プラスミド (インビトロジェン社) およびクローニングしたヒト可溶性 CD4cDNA を有するプラスミドを制限酵素 HindIII (宝酒造社) と制限酵素 NotI (宝酒造社) を用いて消化し、常法によるアガロースゲル電気泳動後、ベクターおよびヒト可溶性 CD4cDNA を抽出精製した。この反応は GeneClean II Kit (Bio 101 社) を用い、添付のプロトコールに従って操作した。これら 2 つの DNA

をライゲーションキットVer. 2 (宝酒造社) を用いて連結し、連結反応産物を大腸菌 DH5株へ導入した。出現したコロニーから数個を選んで培養し、常法に従ってプラスミド DNAを抽出精製した。pcDNA3に存在する適当な制限酵素を用いてこれらプラスミドの切断パターンを調べ、予想されたパターンに一致したものを選び出した。

次に得られたヒト可溶性CD4発現プラスミドを、DEAEデキストラン法 (Bebington, C.R. (1991) ; METHODS : A Companion to Methods in Enzymology, 2 (2), 136-45.) にてそれぞれCOS7細胞へ導入した。COS7細胞を10%ウシ胎児血清 (FBS)加Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) にて、遺伝子組み込みの4日前に直径100mmのディッシュあたり約  $6.1 \times 10^5$  Cells/10ml となるよう蒔き直し、培養した。4日後、まず上清を除き、PBS(-) にて細胞を静かに洗浄して、4mlの10% FBS加DMEMを加え、次いでDEAEデキストラン/ヒト可溶性CD4発現プラスミド混合液を細胞へ均一にふりかけて、37℃で4時間インキュベートした。この混合液は20mg/mlのDEAEデキストラン (ファルマシア社) 水溶液と、ヒト可溶性CD4発現プラスミドをTBS(-)(20mM Tris · HCl (pH7.4), 0.15M NaCl)により  $0.17 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  とした溶液を2:1 (v/v) で混合したものであり、ディッシュあたり  $180 \mu\text{l}$  を添加する。インキュベーション後、上清を捨て、10%ジメチルスルフォキシド (DMSO) 添加PBS(-)5mlを加えて1分静置した。次いで上清を捨て、PBS(-)で洗浄後、 $100 \mu\text{M}$  クロロキン (Sigma社) 入りの2% FBS添加DMEM 7mlを加え、37℃で3時間インキュベートした。その後、上清を捨て、PBS(-)で洗浄して、10% FBS加DMEM 10mlを加え、培養した。翌日、PBS(-)及びDMEMにて、FBS加DMEMをよく除去した後、無血清のDMEM 10mlを加え、生産を開始した。

生産開始から3日後培養上清を回収し、以後約2週間生産を続けた。得られた培養上清を集め、抗FLAG-M2 ゲル (イーストマンケミカル社) カラムクロマトグラフィーにより精製し、これをヒト可溶性CD4の精製標品とした。



## 〔実施例 2〕

抗ヒトCD4抗体産生ハイブリドーマ4H5(受託番号FERM BP-6729)は、10%FBS(ICN社)を添加したDMEM培地(GIBCO社)で培養した。あらかじめハイブリドーマは、限界希釈法で、クローンを分離したのち、培養上清をヒト可溶性CD4(リプリジェン社)を固相化したELISA法にてヒト可溶性CD4への結合性の高いクローンを選択した。この細胞 $1 \times 10^7$ 個からmRNAをQuickPrep mRNA Purification Kit(ファルマシア社)を使用し、添付の説明書に従って単離した。得られたmRNAを鋳型として、1st strand cDNAを合成した。これは、cDNA Synthesis Kit(ファルマシア社)を使用し、添付の説明書に従って行った。その後、PCR法により、上記で取得したcDNAをテンプレートとして、目的の遺伝子の増幅を行った。

H鎖の取得に関しプライマーは、Mouse Ig-Prime Kit(ノバジェン社)を使用し、配列表配列番号13(5' GGGAATTCATGRAATGSASCTGGGTYWYCTCTT 3')及び配列番号14(5' CCAAGCTTCCAGGGRCCARKGGATACNGRTGG 3')の配列を持つプライマーから遺伝子が増幅された。PCR条件は、GeneAmp PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase(宝酒造社)を用い、94°C 1分、50°C 1分、72°C 2分を1サイクルとして、30サイクル行った。PCR装置は、型名DNA Thermal Cycler 480(パーキンエルマー社)を使用した。増幅された遺伝子断片は、TA cloning kit(インビトロジェン社)を使用し、クローニングした。

L鎖の取得に関し、予めL鎖ペプチドのN末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー(Applied Biosystems社 492 Protein Sequencer)により、N末端から15残基を添付のプロトコールに従って決定した。センスプライマーは、このN末端アミノ酸配列を基にコードしうる塩基配列を複数合成した。アンチセンスプライマーは、マウス抗体遺伝子cDNAが合成しうる配列候補をSequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edition, 1991(USA NIH 発行)に掲載されたマウス抗体可変領域の遺伝子配列を参考にして複数合成した。それらセンスプライマーとアンチセンスプライマーを組み合わせたPCR法を行った。配列表配列

番号15 (5' TGTGCCCTCGAGCTNACNCARAGYCCNGC 3') 及び配列番号16 (5' ATGGATACTA GTGGTGCAGCATCAGCCC 3')の配列を持つプライマーからL鎖可変領域遺伝子(部分長)が増幅された。PCR条件はGeneAmp PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase (宝酒造社)を用い、94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 2分を1サイクルとして、30サイクル行った。PCR装置は、型名DNA Thermal Cycler 480 (パーキンエルマー社)を使用した。増幅された遺伝子断片は、TA cloning kit (インビトロジェン社)を使用し、クローニングした。

これら得られた遺伝子のH鎖及びL鎖の可変領域(部分長)塩基配列を決定した。塩基配列の決定はDNA シークエンサー Ver.1. 2. 0, Model373A (Applied Biosystems社)を用い、メーカーのプロトコールに従って行った。標識反応は、Universal M13 Reverse primer (インビトロジェン社)またはUniversal M13 Forward primer (インビトロジェン社)をプライマーとして、PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems社)を用い、方法は添付のプロトコールに従った。染色は、ABI社のラベリングキットを利用した。

更にL鎖の取得に関し、N末端部の未取得領域を取得するために再度PCR法により、目的の遺伝子の増幅を行った。プライマーは、Mouse Ig-Prime Kit (ノバジェン社)と取得したL鎖「CDR-3」cDNAに相補的な塩基配列を使用し、配列表配列番号17 (5' GGGAATTCATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT 3') および配列番号18 (5' CGTCGGAGGATCCTCACTACT 3')の配列を持つプライマーから遺伝子が増幅された。

PCR条件はGeneAmp PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase (宝酒造社)を用い、94℃ 1分、50℃ 1分、72℃ 2分を1サイクルとして、30サイクル行った。PCR装置は、型名DNA Thermal Cycler 480 (パーキンエルマー社)を使用した。増幅された遺伝子断片は、TA cloning kitを使用し、クローニングし、同様にL鎖の可変領域(N末端部)塩基配列を、決定した。先にpCR2.1プラスミド(TA cloning kitに添付)上にクローニングされたL鎖の可変領域(部分長)中の

制限酵素 PflMI サイトと HindIII サイトを利用し、L鎖の可変領域（N末端部）とL鎖の可変領域（部分長）の遺伝子を組換え、L鎖可変領域（完全長）の遺伝子断片を構築した。制限酵素 PflMI は New England Biolabs 社、制限酵素 HindIII は宝酒造社のものを使用した。アガロースゲル電気泳動後の抽出精製には Gene CleanII Kit (Bio 101 社) を用い、添付のプロトコールに従って操作した。これら 2 つの DNA の連結には、ライゲーションキット Ver. 2 (宝酒造社) を用いた。

以上の操作により決定した 4H5 抗体 H 鎖可変領域（完全長）の遺伝子配列をアミノ酸配列とともに配列表配列番号 37、L 鎖可変領域（完全長）の遺伝子配列をアミノ酸配列とともに配列表配列番号 38 に示した。

### 〔実施例 3〕

実施例 2 で得られた抗ヒト CD 4 抗体 (4H5 抗体) の H 鎖（アミノ酸 4 位から 118 位）、L 鎖（アミノ酸 4 位から 111 位）可変領域塩基配列を含む遺伝子断片を pG1 プラスミドへ組み込み、抗 CD 4 ヒトマウスキメラ抗体を発現可能なプラスミドを作製した。H 鎖可変領域の遺伝子断片を含むクローンのパラスミド DNA をテンプレートとして配列表配列番号 19 (5' CAGGATCCGCTGCAGCAGTCTGGACCT 3') および配列番号 20 (5' TGGGCCCCGTCGTTTTGGCTGCAGAGAC 3') の配列を持つプライマーを用いて、ApaI 及び BamHI 制限酵素サイトを新たに導入した H 鎖可変領域断片を PCR 法により作製した。PCR 条件は、GeneAmp PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase (宝酒造社) を用い、94°C 1 分、55°C 1 分、72°C 2 分を 1 サイクルとして、30 サイクル行った。PCR 装置は、型名 DNA Thermal Cycler 480 (パーキンエルマー社) を使用した。増幅された断片を TA cloning kit (インビトロジェン社) を使用し、クローニングした。この H 鎖（アミノ酸 4 位から 118 位）可変領域塩基配列を含む DNA 断片を制限酵素 ApaI (宝酒造社) 及び BamHI (宝酒造社) で消化後、2 % アガロース電気泳動ゲルにて展開し、切り出し抽出した。アガロース電気泳動ゲルからの DNA 断片の抽出には、GeneCleanII Kit (Bio 101 社) を用い、添付のプロトコールに従って操作を行った。

次に、ベクター pG1を制限酵素ApaI及び BamHIで消化後、0.7%アガロース電気泳動ゲルから同様に切り出し抽出したものと連結した。連結反応物を大腸菌JM 109株へ導入した。この連結反応には、ライゲーションキットver. 2 (宝酒造社)を用いた。形質転換した大腸菌をアンピシリン含有LBプレートに蒔いて一晚培養し、出現したコロニーの中から数個を選び、常法に従ってプラスミド DNAを抽出精製した。これらを組み込みに用いた制限酵素ApaI及び BamHIにて消化し、H鎖可変領域塩基配列を含む断片が挿入されたものを選び出した。次にL鎖に関し、実施例2にて取得した配列表配列番号13 (5' TGTGCCCTCGAGCTNACNCARAGYCCNGC 3') 及び配列番号14 (5' ATGGATACTAGTGGTGCAGCATCAGCCC 3')の配列を持つプライマーから遺伝子が増幅されたクローンのプラスミドDNA(L鎖 (アミノ酸4位から111位) 可変領域塩基配列を含む遺伝子断片)を制限酵素XhoI (宝酒造社) 及びSpeI (宝酒造社)で消化後、1%アガロース電気泳動ゲルにて展開し、L鎖可変領域塩基配列を含む DNA断片を切り出し抽出した。アガロースゲルからの DNA断片の抽出には、GeneCleanII Kit (Bio 101社)を用い、添付のプロトコールに従って操作を行った。次に、H鎖可変領域塩基配列を含む DNA断片が挿入されたベクターpG1 を制限酵素XhoI及びSpeIで消化後、0.7%アガロースゲルにて同様に切り出し抽出したものと連結し、連結反応物を大腸菌JM 109株へ導入した。この連結反応には、ライゲーションキットver. 2 (宝酒造社)を用いた。形質転換した大腸菌をアンピシリン含有LBプレートに蒔いて一晚培養し、出現したコロニーの中から数個を選び、常法に従ってプラスミド DNAを抽出精製した。これらを組み込みに用いた制限酵素XhoI及びApaIにて消化し、H鎖及びL鎖可変領域塩基配列を含む断片が挿入されたものを選び出した。以上の方法にて得られた分泌型抗体発現プラスミドをpG14H5とした。

#### 〔実施例4〕

実施例3にて得られた分泌型抗体発現プラスミドpG14H5を、DEAEデキストラン法 (Beb-bington, C.R. (1991) ; METHODS : A Compa-nion to Methods in Enzy

mology, 2 (2), 136-45.)にてそれぞれCOS7細胞へ導入した。COS7細胞を10%ウシ胎児血清 (FBS)加Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) にて、遺伝子組み込みの4日前に直径100mmのディッシュあたり約  $6.1 \times 10^5$  Cells/10mlとなるよう蒔き直し、培養した。4日後、まず上清を除き、PBS(-)にて細胞を静かに洗浄して、4mlの10% FBS加DMEMを加え、次いでDEAEデキストラン/分泌型抗体発現プラスミド混合液を細胞へ均一にふりかけて、37°Cで4時間インキュベートした。この混合液は20mg/mlのDEAEデキストラン (ファルマシア社) 水溶液と、分泌型抗体プラスミドを、TBS(-)(20mM Tris · HCl (pH7.4), 0.15M NaCl)により  $0.17 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  とした溶液を2:1 (v/v) で混合したものであり、ディッシュあたり  $180 \mu\text{l}$  を添加する。インキュベーション後、上清を捨て、10%ジメチルスルフォキシド (DMSO) 添加PBS(-) 5ml を加えて1分静置した。

次いで上清を捨て、PBS(-) で洗浄後、 $100 \mu\text{M}$  クロロキン(Sigma社) 入りの2% FBS添加DMEM 7mlを加え、37°Cで3時間インキュベートした。その後、上清を捨て、PBS(-) で洗浄して、10% FBS加 DMEM 10mlを加え、培養した。翌日、PBS(-) 及びDMEMにて FBS加DMEMをよく除去した後、無血清のDMEM 10ml を加え、生産を開始した。

生産開始から3日後培養上清を回収し、以後約2週間生産を続けた。得られた培養上清を集め、プロテインGセファロースカラムクロマトグラフィーにより精製し、これをヒトマウスキメラ抗CD4抗体の精製標品とした(以下キメラ4H5抗体とする)。

#### [実施例5]

実施例1において調製したヒト可溶性CD4をSuperdex 200ゲル濾過カラム (ファルマシア社) とSMARTsystem(ファルマシア社) を用いて、10mM酢酸緩衝液pH=5.0 にbuffer置換した。このヒト可溶性CD4液( $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $20 \mu\text{l}$ )をセンサーチップ CM5 (ファルマシア社) のそれぞれ異なるレーンに  $5 \mu\text{l}/\text{min}$  で送液することによりアミンカップリング法にて固定化し、ヒト可溶性CD4固定化セン

サーチチップを得た。

4H5 抗体またはキメラ 4H5抗体（実施例 4 で調製）をSuperdex 200ゲル濾過カラム（ファルマシア社）とSMARTsystem（ファルマシア社）を用いて、HBSbuffer（ファルマシア社）にbuffer置換した。BIA-core2000（ファルマシア社）を用いて、先に作製したヒト可溶性CD4 固定化センサーチップ上に、この 4H5抗体液またはキメラ 4H5抗体液（ $50 \mu\text{g/ml}$ 、 $20 \mu\text{l}$ ）をアナライトとして、 $5 \mu\text{l/min}$  で各レーンに送液し結合時のセンサグラムを得た。その後HBSbuffer のみを $5 \mu\text{l/min}$  でセンサーチップの各レーンに送液し解離時のセンサグラムを得た。このセンサグラムの解析によりヒト可溶性CD4 と抗ヒトCD4 抗体との解離定数（KD：この値が低いほど結合親和性は高い）を得た。その結果、4H5抗体は $KD=8.08 \times 10^{-10} \text{M}$ （ $K_{on}=6.60 \times 10^3 \text{M}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$ 、 $K_{off}=5.33 \times 10^{-6} \text{S}^{-1}$ ）であり、キメラ 4H5抗体では $KD=1.24 \times 10^{-9} \text{M}$ （ $K_{on}=2.36 \times 10^4 \text{M}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$ 、 $K_{off}=2.92 \times 10^{-5} \text{S}^{-1}$ ）であり、ヒトCD4 抗原に強く結合しうることが明らかとなった。

#### 〔実施例 6〕

キメラ 4H5抗体の工業生産利用しうる、安定な高生産株を取得した。工業生産の場合の宿主としては CHO細胞、ミエローマSp 2/0細胞がよく知られている（Xiang, J. et al. (1990) Mol. Immun., 27, 809; Bebbington, C.R. et al. (1992) Bio/technology, 10, 169 ; Larrick, J.W. and Wallace, E.F. et al. (1992) Immunol. Rev. 130, 69-85.; Deyev, S.M. and Lieber, A. et al. (1994) Appl. Biochem. Biotechnol. 47 (2-3), 143-54.）。例えば CHO細胞では、MTX等の薬剤により生産性の高いクローンを選択する方法も報告されており（Bebbington, C.R. (1991) METHODS : A Companion to Methods in Enzymology, 2 (2), 136-45)この方法を参考にし、安定なキメラ 4H5抗体の高生産株を取得した。

すなわち、CHOdhfr-株（ATCC CRL-9096）を電気穿孔法用緩衝液（ $272 \text{mM}$  sucrose,  $7 \text{mM}$  リン酸緩衝液、 $1 \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{pH}=7.4$ ）に  $1.0 \times 10^7$  cells/mlの濃度に調製し、電気穿孔法用キュベット（bio-rad社）に  $500 \mu\text{l}$  を分注し、氷冷した。ここに実

施例 3 において作製した pG14H5 プラスミド  $10 \mu\text{g}$  と pSV2dhfr プラスミド (ATCC No. 37146)  $1 \mu\text{g}$  を混合し、5 分間氷冷した。  $3 \mu\text{F}$ 、 $0.55\text{kV}$  の電気パルスを与え、1 分間氷冷した。もう一度  $3 \mu\text{F}$ 、 $0.55\text{kV}$  の電気パルスを与え、5 分間氷冷した。この電気パルスの負荷は bio-rad 社のジーンパルサーを用いて行った。細胞を F12 培地 (GIBCO 社) に 10% FBS を添加した培地  $10\text{ml}$  に移し、 $100\text{mm}$  組織培養用 dish (FALCON 社) において  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下で一晩培養した。この細胞をトリプシン-EDTA 液 (GIBCO 社) を用いて dish から剥離し、DMEM 培地 (GIBCO 社) に 10% 透析 FBS (GIBCO 社) を添加した培地  $120\text{ml}$  に移し、 $150\text{mm}$  組織培養用 dish 4 枚に播種した。2 から 3 日毎に同培地で培地交換を行った。約 2 週間程度で肉眼で観察できる程度に細胞のコロニーが形成される。

コロニーを数十個単離し、それぞれ MTX (Amethopterin; SIGMA 社)  $20\text{nM}$  を添加した DMEM 培地 + 10% 透析 FBS (GIBCO 社) で培養した。2 から 3 日毎に同培地で培地交換を行い一ヶ月培養した。MTX 薬剤耐性を獲得したクローン (同培地中で増殖し得るクローン) をそれぞれ MTX  $100\text{nM}$  を添加した DMEM 培地 + 10% 透析 FBS 培地で培養した。2 から 3 日毎に同培地で培地交換を行い一ヶ月培養した。最終的に  $100\text{nM}$  MTX 薬剤耐性を獲得したクローン (同培地中で増殖し得るクローン) の培養上清中のキメラ 4H5 抗体濃度を human Immunoglobulin G (IgG) subclass EIA kit (The Binding site 社) の IgG1 用を用いて測定し、安定なキメラ 4H5 抗体の高生産株を選択した。これらの手法により、キメラ 4H5 抗体を  $5 \mu\text{g}/10^6 \text{cells/day}$  の割合で生産する安定発現株を作製した。

#### 〔実施例 7〕

抗体遺伝子を ScFv 抗体産生用ベクターに組み込むため、実施例 2 で得た配列表配列番号 37 及び配列番号 38 に記載の遺伝子を、制限酵素配列及びリンカー配列を含むプライマーを使用し、PCR 法で増幅させた。L 鎖用プライマーは、配列表配列番号 27 (5' AGCCGGCCATGGCCGACATTGTGCTGACCCAATCTCCA 3') 及び配列番号 28 (5' CTCGGAGC AACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCTTTGATTTCCAGCTTGGTGCCTCC 3')、H 鎖用プ

ライマーは、配列表配列番号29 (5' CTCCGGAGGTGGCGGATCGCAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCT 3')、及び配列番号30 (5' TGCGGCCGCTGCAGAGACAGTGACCAGAGTC 3') を使用した。

PCR条件はGeneAmp PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase (宝酒造社) を用い、94℃ 45秒、58℃ 45秒、72℃ 1分を1サイクルとして、18サイクル行った。PCR装置は、型名DNA Thermal Cycler 480 (パーキンエルマー社) を使用した。増幅された断片をそれぞれTA cloning kit (インビトロジェン社) を使用し、クローニングした。この遺伝子をL鎖は制限酵素NaeI (宝酒造社) 及びMroI (東洋紡社) で消化し、H鎖は制限酵素MroI (東洋紡社) 及びNotI (宝酒造社) で消化した後、2%アガロースゲルにて電気泳動し各々のDNA断片を切り出し抽出した。アガロースゲルからのDNA断片の抽出には、Gene CleanII Kit (Bio 101 社) を用いて行った。

参考例2において調製したpSE380ScFvまたはpET24ScFv ベクターを制限酵素NaeI (宝酒造社) 及びNotI (宝酒造社) で消化した後、1%アガロースゲルにて電気泳動し各々のDNA断片を切り出し抽出した。これを上記で制限酵素消化したL鎖及びH鎖DNA断片と連結した。ライゲーションは、ライゲーションVer. 2キット (宝酒造社) を使用した。またアガロースゲルからのDNA断片の抽出には、GeneCleanII Kit (Bio 101社) を用いて行った。以上の操作によって得られたプラスミドをそれぞれ大腸菌DH5株へ導入した。形質転換した大腸菌をpSE380ScFvベクター由来のものはアンピシリン含有LBプレート、またはpET24ScFvベクター由来のものはカナマイシン含有LBプレートに蒔いて一晚培養し、出現したコロニーの中から数個を選び、常法に従ってプラスミドDNAを抽出精製した。適当な制限酵素を用いてこれらプラスミドの切断パターンを調べ、予想されたパターンに一致したものを選び出した。以上の操作によって得られた、抗CD4抗体の配列を有する4H5ScFv(N末VL-linker-VH C末型: 以下LH型) 抗体を発現するプラスミドをそれぞれpSE380ScFv4H5LH またはpET24ScFv4H5LHとした。また配列表配列番号9に、1本鎖抗体(ScFv4H5LH)のアミノ酸配列をそれをコードする核酸塩基配列



の1例とともに示した。

〔実施例8〕

抗体遺伝子をScFv抗体産生用ベクターに組み込むため、実施例2で得た配列表配列番号37及び配列番号38に記載の遺伝子を、制限酵素配列及びリンカー配列を含むプライマーを使用し、PCR法で増幅させた。H鎖用プライマーは、配列表配列番号31 (5' AGCCGGCCATGGCCCAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCT 3') 及び配列番号32 (5' CTC CGGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCTGCAGAGACAGTGACCAGAGTC 3')、L鎖用プライマーは、配列表配列番号33 (5' CTCCGGAGGTGGCGGATCGGACATTGTGCTGACCCAATCTCCA 3')、及び配列番号34 (5' TGCGGCCGCTTTGATTTCCAGCTTGCTGCCTCC 3')を使用した。PCR条件はGeneAmp PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase (宝酒造社)を用い、94℃ 45秒、58℃ 45秒、72℃ 1分を1サイクルとして、18サイクル行った。PCR装置は、型名DNA Thermal Cyclor 480 (パーキンエルマー社)を使用した。増幅された断片をそれぞれTA cloning kit (インビトロジェン社)を使用し、クローニングした。この遺伝子をH鎖は制限酵素NaeI (宝酒造社)及びMroI (東洋紡社)で消化し、L鎖は制限酵素MroI (東洋紡社)及びNotI (宝酒造社)で消化した後、2%アガロースゲルにて電気泳動し各々のDNA断片を切り出し抽出した。アガロースゲルからのDNA断片の抽出には、GeneCleanII Kit (Bio 101社)を用いて行った。

参考例2において調製したpSE380ScFvまたはpET24ScFvベクターを制限酵素NaeI (宝酒造社)及びNotI (宝酒造社)で消化した後、1%アガロースゲルにて電気泳動し各々のDNA断片を切り出し抽出した。これを上記で制限酵素消化したH鎖及びL鎖DNA断片と連結した。ライゲーションは、ライゲーションVer. 2キット (宝酒造社)を使用した。またアガロースゲルからのDNA断片の抽出には、GeneCleanII Kit (Bio 101社)を用いて行った。以上の操作によって得られたプラスミドをそれぞれ大腸菌DH5株へ導入した。形質転換した大腸菌をpSE380ScFvベクター由来のものはアンピシリン含有LBプレート、またはpET24ScFvベクター由来

のものはカナマイシン含有LBプレートに蒔いて一晚培養し、出現したコロニーの中から数個を選び、常法に従ってプラスミド DNAを抽出精製した。適当な制限酵素を用いてこれらプラスミドの切断パターンを調べ、予想されたパターンに一致したものを選び出した。以上の操作によって得られた、抗CD4抗体の配列を有する4H5ScFv (N末 VH-linker-VL C末型：以下HL型) 抗体を発現するプラスミドをそれぞれpSE380ScFv4H5HL またはpET24ScFv4H5HLとした。また配列表配列番号10に、1本鎖抗体 (ScFv4H5HL) のアミノ酸配列をそれをコードする核酸塩基配列の1例とともに示した。

#### 〔実施例9〕

実施例7のpSE380ScFv4H5LH プラスミドでトランスフォームした大腸菌DH5株を100  $\mu$ g/mlアンピシリンおよび1%グリセロール添加2×YT培地(1.6%バクトトリプトン、1%バクトイーストエキストラクト、0.5%NaCl)にて培養した。翌日この一部を10倍量の上記培地に加え、1時間培養した後上清を除き、1mMのIPTG、100  $\mu$ g/mlアンピシリンおよび1%グリセロール添加2×YT培地の等量に換えて、さらに3時間培養した後、培養上清を除去した菌体を培養容積の1/10量の氷冷したTES液(200mM Tris-HCl (pH=8.0)、0.5mM EDTA、0.5Mスクロース)に懸濁した。10分氷温で放置した後、14000回転/分、4℃、20分遠心分離した。上清を除き、培養容積の1/10量の氷冷したTE液(10mM Tris-HCl (pH=8.0)、0.5mM EDTA)に懸濁した。30分氷温で放置した後、14000回転/分、4℃、20分遠心分離することにより、ペリプラズム中の抗体を回収した。得られた抗体粗画分を抗FLAG-M2ゲル(イーストマンケミカル社)カラムクロマトグラフィーにより精製し、さらにTALON metal affinityゲル(クロンテック社)により精製した。カラムクロマトグラフィーはそれぞれゲルに添付のプロトコールに従って行った。これを抗ヒトCD4 1本鎖抗体 (ScFv4H5LH) の精製標品とした。

実施例1において調製したヒト可溶性CD4のPBS(-)溶液(5.2  $\mu$ g/ml)をポリスチレン96穴プレートに50  $\mu$ l ずつ分注し、4℃一晚静置することによって抗

原を固定化した。上清を除去したのち0.05%Tween20加PBS(-) (以下PBS-T) 250  $\mu$ l で洗浄した。ブロックエース (大日本製薬)100  $\mu$ l を個々のウェルに分注し、室温で1時間静置することによってブロッキングを行った。個々のウェルの上清を除去したのち、PBS-T 250  $\mu$ l で2回洗浄した。上清を除去後、上記で調製した抗ヒトCD4 1本鎖抗体 (ScFv4H5LH)のPBS(-) 溶液、10  $\mu$ g/ml、50  $\mu$ l を分注し、室温で2時間静置反応した。上清を除去したのちPBS-T 250  $\mu$ l で3回洗浄した。上清を除去した後、1000倍に PBS-Tで希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗 myc抗体 (インビトロジェン社) 50  $\mu$ l を個々のウェルに分注し、室温で2時間静置した。上清を除去したのちPBS-T 250  $\mu$ l で3回洗浄した。上清を除去後、オルトフェニレンジアミン (SIGMA社) のPBS(-) 溶液に0.01% $H_2O_2$ を添加した発色液50  $\mu$ l を加え、室温で7分間反応後、2N硫酸液50  $\mu$ l を加え酵素反応を停止した。このプレートの 490nmにおける吸光度を測定した。その際の吸光度は 0.574であった。また、ヒト可溶性CD4の固定化操作のみをせずに同様の実験を行ったところ、吸光度は 0.109であった。これらの結果より抗ヒトCD4 1本鎖抗体 (ScFv4H5LH)はヒトCD4を認識し、親和性を持つことが示された。

〔実施例10〕

2-ヨードアセトアミド (東京化成社)50gを蒸留水 100mlに懸濁し、37%ホルムアルデヒド (和光純薬工業社) 20mlを加え50℃攪拌下で溶解した。炭酸カリウム 25.2gを徐々に加え、スターラーで10分間攪拌後、室温にて2時間放置した。さらに4℃で一晩静置したのち、上清をデカンテーションにより捨て、蒸留水を40ml加えたのち50℃で沈殿を溶解し、室温にて2時間放置し、さらに4℃で一晩再び静置した。この操作をもう一度繰り返してから、生じた沈殿を G-3のガラスフィルター (フィルター径30mm: 日本理化学器械 (株) 社) を通過させることにより回収し、1時間アスピレーターにて吸引乾燥してから、24時間凍結乾燥し、水不溶性担体に導入可能な抗体固定化用活性基であるN-ヒドロキシメチルヨードアセトアミドを調製した。

ガラス製のフラスコに硫酸 5.7ml、ニトロベンゼン 7.2ml及びパラホルムアルデヒド 0.0363gを加え、攪拌下溶解後、N-ヒドロキシメチルヨードアセトアミド 0.58gを加え攪拌した。これにポリプロピレンからなる不織布（平均繊維直径  $3.3\mu\text{m}$ ）0.3g を入れ室温にて一晩反応した。反応後不織布を取り出し、純水にて洗浄し、これを真空乾燥して、抗体固定化用活性基を導入した不織布を得た。この不織布を直径 0.7cmの円に切断し、それぞれ4枚ずつをPBS(-)に溶解した抗ヒトCD4抗体(4H5抗体)液 ( $17.7\mu\text{g}/400\mu\text{l}$ )または実施例9にて調製した抗ヒトCD4 1本鎖抗体 (ScFv4H5LH)液 ( $17.7\mu\text{g}/400\mu\text{l}$ )に室温にて2.5時間浸し、抗体を固定した。2.5時間後、PBS(-)で洗浄した。入口と出口を有する容量1mlの容器に4枚充填しカラムを作成した。また比較対照として牛血清アルブミン(BSA; ピアス社アルブミンスタンダード)を抗体の代わりに同様に固定化したカラムも作成した。

ヒト健常人血液より実施例1と同様に、フィコールパック（ファルマシア社）を使った密度勾配遠心法により単核細胞層の細胞を回収した。回収した細胞をPBS(-)で洗浄し、 $1.2 \times 10^6$  個/ml に調整した。この単核球浮遊液4mlをシリッジポンプを用いて流速1ml/分で送液し、上記で作製したカラムの入口より流した。カラム出口より処理後の液を回収した。この時のCD4陽性細胞の比率を、公知のフローサイトメトリー法（FACS）で測定した。FACS解析の際の細胞の染色はFITC標識抗CD4抗体（ファーマンジェン社）を用い、FACSCalibur（ベクトン・ディッキンソン社）を用いて測定した。

第1表にカラム通過前後でのCD4陽性細胞と他の細胞（CD4陰性細胞）の比率を示した。また、この実施例の際の4H5抗体固定化カラム通過後のCD4陽性細胞の除去率は100%、ScFv4H5LH固定化カラム通過後のCD4陽性細胞の除去率は99.9%であった。これらの結果より抗ヒトCD4 1本鎖抗体 (ScFv4H5LH) は4H5抗体に比べ、CD4陽性細胞に対しての結合親和性および特異性が4H5抗体と実質的に同じ機能であることが明らかとなった。

第 1 表

	C D 4 陽性細胞の比率	他の細胞の比率
カラム通過前	39.3 %	60.7%
4H5 抗体固定化カラム通過後	0.3 %	99.7%
ScFv4H5LH 固定化カラム通過後	2.6 %	97.4%
牛血清アルブミン固定化 カラム通過後	45.0 %	55.0%

〔実施例 1 1〕

4H5 ハイブリドーマの取得は、以下のようにして行った。

血液をフィコールハイパックに重層し、遠心後、単核白血球層を回収し、さらに抗CD 8 抗体でCD 8 陽性細胞を免疫沈降除去することでC D 4 リンパ球を濃縮した画分を得た。さらにこの細胞画分をPHAレクチン（イーワイラボラトリー社）で刺激することで、免疫用細胞を調製した。その細胞をDMEM培地（ギブコ社）で洗浄後、その細胞をアジュバントであるタイターマックス（CytRx 社）と混合し、マウス当たり約  $2 \times 10^7$  細胞をBalb/cマウス（日本チャールズリバー社）腹腔内に投与し免疫した。初回免疫から2週間おきに追加免疫を行った。その後初回免疫から、3ヶ月後に、同様に調製した細胞を静注にて追加免疫した。

BALB/cマウス由来の骨髓腫細胞株であるNS1 細胞株（ATCC TIB-18）は、20% FCS添加DMEM培地（ギブコ社）で継代を行った。

上記の免疫動物のマウスから取得した脾臓をほぐし、DMEM培地で洗浄しながらメッシュで濾過後、遠心分離を行い、脾臓細胞を分離した。この脾臓細胞と上記の増殖させたNS1 細胞株を混合した後、遠心分離を行った。混合した細胞に対し、ポリエチレングリコール（ベーリンガー・マンハイム社）の最終濃度が30%となるように懸濁した。

細胞を遠心分離で分離し、マウス脾臓細胞をフィーダーとして、20%牛胎児血清を含むDMEM組織培養培地（ギブコ社）で徐々に分散させた。そして、平底の96穴マイクロタイタープレート（ヌンク社製）のウェルに、1ウェル当たり106個

／100  $\mu$ l の細胞数の細胞を植え、5 %の二酸化炭素中37℃で培養した。

細胞融合後1日目に、各ウェルに100  $\mu$ l の HAT培地（上記の増殖培地に13.6  $\mu$ g/mlヒポキサンチン、3.88  $\mu$ g/mlチミジン及び0.18  $\mu$ M アミノプテリンとなるようにそれぞれを補充した）を添加した。その後3日間は、毎日、約半分のHAT培地を新しい HAT培地と交換し、更にその後は、2～3日ごとに同様の交換を行った。ハイブリドーマ（融合細胞）のクローンはHT培地（アミノプテリンを含まない HAT培地）で培養、保持した。

上記のハイブリドーマ複数個を、限界希釈法にてサブクローニングした。これらのハイブリドーマの細胞数を、トリパン青染料排除法及び血球計により計数を行った。そして、これらのハイブリドーマを、100  $\mu$ l のHT培地当たり、0.5 個の生育細胞数の割合で懸濁し、96穴の平底マイクロプレートの1ウェル当たり100  $\mu$ l ずつ分注した。これを2～3日ごとに培地を交換して、ハイブリドーマを増殖させた。

得られたハイブリドーマの培養上清を、ヒト白血球と反応させ、ヒト白血球のCD4陽性細胞を認識する抗体を検出した検出は、FACSscan（ベクトンディッキンソン社）で行った。本操作により、得られた抗体群より、特異性、結合性の優れた4H5細胞を取得することに成功した。

#### 〔実施例12〕

4H5 抗体の生産と精製を行った。抗ヒトCD4抗体産生ハイブリドーマ4H5（受託番号 FERM BP-6729）は、10%ウシ胎児血清（FBS）（ICN社）を添加したDMEM培地（GIBCO社）で培養した。あらかじめハイブリドーマは、限界希釈法で、クローンを分離したのち、この培養上清をヒト可溶性CD4（リプリジェン社）を固相化したELISA法にてヒト可溶性CD4への結合性の高いクローンを選択した。この4H5ハイブリドーマクローンをBalb/cマウスの腹腔内に移植後、増殖させ、得られた腹水をProteinAセファロース（ファルマシア社）を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、4H5 抗体精製標品を得た。

## 〔実施例 1 3〕

実施例 1 において調製したヒト可溶性 C D 4 の PBS(-) 溶液 ( $5.2 \mu\text{g/ml}$ ) をポリスチレン 96 穴プレート (NUNC 社) に  $50 \mu\text{l}$  ずつ分注し、 $4^\circ\text{C}$  一晚静置することによって抗原を固定化した。上清を除去したのち  $0.05\%$  Tween20 加 PBS(-) (以下 PBS-T)  $250 \mu\text{l}$  で洗浄した。ブロックエース (大日本製薬)  $100 \mu\text{l}$  を個々のウェルに分注し、室温で 1 時間静置することによってブロッキングを行った。個々のウェルの上清を除去したのち PBS-T  $250 \mu\text{l}$  で 2 回洗浄した。上清を除去後、様々な濃度に調整した 4H5 抗体 (実施例 1 2 で調製、アイソタイプは IgG1- $\kappa$ ) または MT310 抗体 (ダコ社、アイソタイプは IgG1- $\kappa$ ) の PBS(-) 溶液、 $50 \mu\text{l}$  ずつを分注し、室温で 2 時間静置反応した。上清を除去したのち PBS-T  $250 \mu\text{l}$  で 3 回洗浄した。上清を除去した後、200 倍に PBS-T で希釈した biotin 標識抗マウス IgG (H+L) 抗体 (VECTOR 社)  $50 \mu\text{l}$  を個々のウェルに分注し、室温で 1 時間静置した。上清を除去したのち PBS-T  $250 \mu\text{l}$  で 3 回洗浄した。上清を除去後、100 倍に PBS-T で希釈した vectastain Elite standard kit (VECTOR 社) の A 液と B 液の等量混合液  $50 \mu\text{l}$  を個々のウェルに分注し、室温で 1 時間静置した。上清を除去したのち PBS-T  $250 \mu\text{l}$  で 6 回洗浄した。上清を除去後、オルトフェニレンジアミン (SIGMA 社) の PBS(-) 水溶液に  $0.01\% \text{H}_2\text{O}_2$  を添加した発色液  $50 \mu\text{l}$  を加え、室温で 3 分間反応後、2N 硫酸液  $50 \mu\text{l}$  を加え酵素反応を停止した。このプレートの  $490\text{nm}$  における吸光度を測定した。

図 5 に用いた抗体濃度 (4H5 抗体または MT310 抗体) と吸光度の関係を示した。4H5 抗体の方が MT310 抗体より低い濃度で C D 4 分子を検出可能であり、ヒト C D 4 分子に対してより親和性の高い抗体であることが明らかとなった。

## 〔実施例 1 4〕

4H5 抗体 (実施例 1 2 で調製、アイソタイプは IgG1- $\kappa$ ) および 13B8.2 抗体 (イムノテック社、アイソタイプは IgG1- $\kappa$ ) を Superdex200 ゲル濾過カラム (ファルマシア社) と SMARTsystem (ファルマシア社) を用いて、 $10\text{mM}$  酢酸緩衝液 pH =

5.0 にbuffer置換した。この抗体液(100  $\mu$ g/ml、70  $\mu$ l)をセンサーチップCM5(ファルマシア社)のそれぞれ異なるレーンに5  $\mu$ l/min で送液することによりアミンカップリング法にて固定化し、抗ヒトCD4抗体固定化センサーチップを得た。次に実施例1において調製したヒト可溶性CD4を Superdex200ゲル濾過カラム(ファルマシア社)とSMARTsystem(ファルマシア社)を用いて、HBSbuffer(ファルマシア社)にbuffer置換した。BIA-core2000(ファルマシア社)を用いて、先に作製した抗体固定化センサーチップ上にこのヒト可溶性CD4液(15.2  $\mu$ g/ml、20  $\mu$ l)をアナライトとして、5  $\mu$ l/min でセンサーチップの各レーンに送液し結合時のセンサグラムを得た。その後 HBSbufferのみを5  $\mu$ l/min でセンサーチップの各レーンに送液し解離時のセンサグラムを得た。このセンサグラムの解析によりヒト可溶性CD4と抗ヒトCD4抗体との解離定数(KD: この値が低いほど結合親和性は高い)を得た。

その結果、4H5 抗体は $KD=1.71 \times 10^{-9} M$  ( $K_{on}=1.35 \times 10^5 M^{-1} \cdot S^{-1}$ 、 $K_{off}=2.31 \times 10^{-4} S^{-1}$ ) であり、13B8.2抗体では $KD=7.58 \times 10^{-9} M$  ( $K_{on}=1.82 \times 10^4 M^{-1} \cdot S^{-1}$ 、 $K_{off}=1.38 \times 10^{-4} S^{-1}$ ) であった。しかるに解離定数の比較より、4H5 抗体は13B8.2抗体より、ヒト可溶性CD4 に対しての結合親和性が約 4.4倍高いことが判った。

#### 〔実施例 1 5〕

安定な抗CD4抗体含有製剤を製造した。実施例12で得た4H5抗体をゲルろ過により 100mM塩化ナトリウムを含む20mMリン酸緩衝液、pH=7.4(PBS)に無菌的に置換し、その4H5抗体1mgとヒト血清アルブミン 200mgをPBS に混合し2mlとし、ガラスバイアル瓶に無菌的に注入し密栓した。

#### 〔実施例 1 6〕

安定なヒトマウスキメラ抗CD4抗体含有製剤を製造した。実施例4で得たキメラ4H5抗体をゲルろ過により 100mM塩化ナトリウムを含む20mMリン酸緩衝液、pH=7.4(PBS)に無菌的に置換し、そのキメラ4H5抗体1mgとヒト血清アルブミン



200mgをPBS に混合し 2 mlとし、ガラスバイアル瓶に無菌的に注入し密栓した。

〔実施例 1 7〕

安定な 1 本鎖抗 C D 4 抗体含有製剤を製造した。実施例 9 で得た抗ヒト C D 4 1本鎖抗体 (ScFv4H5LH)をゲルろ過により 100mM塩化ナトリウムを含む20mMリン酸緩衝液、pH=7.4 (PBS) に無菌的に置換し、その 1 本鎖抗体 500マイクログラムとヒト血清アルブミン 200mgをPBS に混合し 2 mlとし、ガラスバイアル瓶に無菌的に注入し密栓した。

〔実施例 1 8〕

抗体遺伝子を単離するためハイブリドーマAnti-My-10(ATCC HB-8483)は、10%牛胎児血清 (Flow社) を添加した、RPMI-1640 培地(Gibco社) で培養した。あらかじめハイブリドーマは、限外希釈法で、クローンを分離し、培養上清を測定しヒト急性骨髄性白血病細胞KG-1a への結合性の高いクローンを選択した。この細胞  $6 \times 10^7$  からTotal RNA をA G P C法 (Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-PhOH-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162, 156-159.)にて分離した。さらに、分離したRNA からmRNAを QuickPrep mRNA Purification Kit(ファルマシア社) を使用し単離した。得られたmRNAを鋳型として、1st strand cDNA を合成した。これは、cDNA Synthesis Kit (ファルマシア社) を使用し、添付の説明書に従い行った。

その後、P C R法により、目的の遺伝子の増幅を行った。プライマーは、マウス抗体遺伝子 c D N Aが合成しうる配列候補を Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edition, 1991(USA NIH 発行) に掲載されたマウス抗体可変領域の遺伝子配列を参考にして複数合成し、それらプライマーを組み合わせたPCR 法を行った。H鎖の取得に関し核酸配列 (5' GTCCCAGGATCCTCTGAAGCAGTCAGGCCC3') 及び(5' ACAGTGGGCCCCGTCGTTTTGGCTGAGGAGA3')を、L鎖の取得に関し (5' TGTGCCCTCGAGGTGACTCAAACCTCCACTCTC3') 及び (5' ATGGATACTAGTGGTGCAGCATCAGCC3') の配列を持つプライマーから遺伝子が増幅された。増幅された遺伝子断片

は、TAcloning kit(インビトロジェン社)を使用し、クローニングした。これら得られた遺伝子のH鎖及びL鎖の可変領域塩基配列を決定した。塩基配列の決定はDNAシーケンサー Ver.1.2.0, Model373A (Applied Biosystems 社)を用い、メーカーのプロトコールに従って行った。標識反応は、H鎖は核酸配列(5' CTCTTGGAGGAGGGTGCCAG3')を、 $\kappa$ 鎖は核酸配列(5' CCAGATTTCAACTGCTCATCAGA3')をプライマーとして、PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems社)を用い、方法は添付のプロトコールに従った。染色は、ABI社のラベリングキットを利用した。その結果、H鎖のプライマーから得られた遺伝子断片を配列表配列番号39、L鎖のプライマーから得られた遺伝子断片を配列表配列番号40に示した。

#### [実施例19]

実施例18で得られた抗CD34抗体のH鎖L鎖可変領域塩基配列を含む遺伝子断片をpG1プラスミドへ組み込み、抗CD34抗体を発現可能なプラスミドを作製した。クローンのプラスミドDNAのL鎖を制限酵素XhoI(宝酒造社)及びSpeI(宝酒造社)で消化後、0.7%アガロース電気泳動ゲルにて展開し、L鎖可変領域塩基配列を含むDNA断片を切り出し抽出した。アガロースゲルからのDNA断片の抽出には、GeneCleanII Kit(フナコシ社)を用い、添付のプロトコールに従って操作を行った。次に、ベクターpG1を制限酵素XhoI及びSpeIで消化後、0.7%アガロースゲルにて同様に切り出し抽出したものと連結した。次にクローンのプラスミドDNAのH鎖可変領域塩基配列を含むDNA断片を制限酵素ApaI(宝酒造社)及びBamHI(宝酒造社)で切り出し抽出した。アガロース電気泳動ゲルからのDNA断片の抽出には、GeneCleanII Kit(フナコシ社)を用い、添付のプロトコールに従って操作を行った。次に、上記でH鎖可変領域塩基配列を含むDNA断片が挿入されたベクターpG1を制限酵素ApaI及びBamHIで消化後、0.7%アガロース電気泳動ゲルから同様に切り出し抽出したものと連結し、連結反応物を大腸菌JM109株へ導入した。この連結反応には、ライゲーションキット

ver. 2(宝酒造社)を用いた。形質転換した大腸菌をアンピシリン含有LBプレートに蒔いて一晚培養し、出現したコロニーの中から数個を選び、常法に従ってプラスミドDNAを抽出精製した。これらを組み込みに用いた制限酵素 XhoI 及び ApaI にて消化し、H鎖及びL鎖可変領域塩基配列を含む断片が挿入されたものを選び出した。以上の方法にて得られた分泌型抗体発現プラスミドをpG1My10 とした。

〔実施例 20〕

実施例 19 にて得られた分泌型抗体発現プラスミド pG1My10 を、DEAEデキストラン法(Beb-bington, C. R. (1991); METHODS: A Companion to Methods in Enzymology, 2(2), 136-45.) にてそれぞれCOS7細胞へ導入した。COS7細胞を10%ウシ胎児血清(FCS) 加 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) にて、遺伝子組み込みの4日前に直径100mm のディッシュあたり約 $6.1 \times 10^5$  細胞/10ml となるよう蒔き直し、培養した。4日後、まず上清を除き、リン酸緩衝生理食塩水(カルシウム、マグネシウム不含)(PBS(-))にて細胞を静かに洗浄して、4ml の10% FCS 加 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)を加え、次いでDEAEデキストラン/分泌型抗体発現プラスミド混合液を細胞へ均一にふりかけて、37℃で4時間インキュベートした。この混合液は20mg/ml のDEAEデキストラン(ファルマシア社 Code No. 1703 50-01, Lot. PF97323)水溶液と、分泌型抗体プラスミドをTB S(-)(20mM Tris · HCl(pH7.4), 0.15M NaCl)により $0.17 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  とした溶液を2:1(v/v)で混合したものであり、ディッシュあたり $180 \mu\text{l}$  を添加する。インキュベーション後、上清を捨て、10%ジメチルスルフォキシド(DMSO)添加PBS(-)5mlを加えて1分静置した。次いで上清を捨て、PBS(-)で洗浄後、 $100 \mu\text{M}$  クロロキン(Sigma社 No. C6628)入りの2% FCS添加 DMEM7mlを加え、37℃で3時間インキュベートした。その後、上清を捨て、PBS(-)で洗浄して、10% FCS添加 DMEM 10mlを加え、培養した。翌日、PBS(-)及びDMEMにてFCS添加DMEMをよく除去した後、無血清のDMEM10mlを加え、生産を開始した。

生産開始から3日後培養上清を回収し、以後約2週間生産を続けた。得られた培養上清を集め、プロテインGセファロースカラムクロマトグラフィーにより精製し、これをヒト、マウスキメラ抗CD34抗体の精製標品とした。

精製標品のCD34抗原への結合は次の方法により確認した。1.5ml チューブに培養細胞KG1aを $1 \times 10^6$  個調製し、細胞懸濁液(2% FCS添加PBS(-))で2回洗浄した。洗浄した細胞に細胞懸濁液を $50 \mu\text{l}$  添加し懸濁した。これに精製標品を $1 \mu\text{g}$  加え、氷中で30分間静置した。その後さらに細胞懸濁液で3回洗浄を行った後、細胞懸濁液を $50 \mu\text{l}$  添加し懸濁する。これにFITC標識ヤギ抗ヒトIgG(Fc) 抗体(1/20 希釈 Immunotec社)を $1 \mu\text{g}$  加え氷中で30分間静置した。その後さらに細胞懸濁液で3回洗浄を行った後、細胞懸濁液を $300 \mu\text{l}$  添加し懸濁する。以上の処理を行った細胞にフローサイトメーター(ベクトンディッキンソン社)でレーザー光を照射することにより細胞上に結合した抗体量を蛍光にて測定した。対照として、精製標品の代わりにミエローマ由来ヒトIgG 抗体を $1 \mu\text{g}$  加え、同様の操作で細胞を処理した。第6図に、精製標品のCD34抗原への結合を示した。抗CD34抗体pG1MY10 由来の精製標品はCD34抗原への結合活性を保持していることが確認され、本ヒト、マウスキメラ抗CD34抗体は、CD34抗原に対する結合活性があることが実証された。また、本精製標品によって、CD34陽性細胞を検出しうることを確認した。

#### 〔実施例21〕

抗体遺伝子をScFv抗体産生用ベクターに組み込むため、実施例19で得た遺伝子を制限酵素配列を含むプライマーを使用し、PCR法で増幅させた。H鎖用プライマーの核酸配列は、(5' GCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGAAGCAGTCAG 3')及び(5' AGACGGTGACCGTGCGCTTGGCCCC3')、L鎖用プライマーの核酸配列は、(5' TCGAGCTCACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCT3')、及び(5' CACCTGCGGCCGCCGTTTCAGCTC 3')を使用した。PCR条件はGeneAmp PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase(宝酒造社)を用い、94°C 1分、55°C 1分、72°C 2分を1サイクルとし

て、30サイクル行った。PCR装置は、型名DNA Thermal Cycler 480（パーキンエルマー社）を使用した。この増幅した遺伝子をH鎖は制限酵素 SfiI（東洋紡社）及びBstP（宝酒造社）で消化し、L鎖は制限酵素 SacI（宝酒造社）及びNotI（宝酒造社）で消化した後、1.5 %アガロースゲルにて電気泳動し各々のDNA断片を切り出し抽出した。アガロースゲルからのDNA断片の抽出には、Gene CleanII Kit（フナコシ社）を用いて行った。

ScFv抗体を産生するベクターは、抗CD34抗体遺伝子を導入する前にあらかじめ任意の抗体遺伝子を産生するプラスミドの作成を行った。Recombinant Phage Antibody System キット（ファルマシア社）を用いて、抗体を産生するハイブリドーマの任意の遺伝子を組み込んだ。そのベクターの作成方法は、このキットに添付された説明書に従った。

この任意の抗体遺伝子を含むプラスミドを、制限酵素SacI（宝酒造社）及びNotI（宝酒造社）で消化後 0.8%アガロースゲルにて電気泳動し、L鎖領域が欠失したベクターDNA断片を抽出精製した。このDNA断片と、先に調製した抗CD34抗体のL鎖遺伝子を連結してL鎖遺伝子を組み入れた。次に、L鎖が入れ替わったプラスミドを制限酵素 SfiI（東洋紡社）及び、BstPI（宝酒造社）で消化後 0.8%アガロースゲルにて電気泳動し、H鎖領域が欠失したベクターDNA断片を抽出精製した。このDNA断片と、先に調製した抗CD34抗体のH鎖遺伝子を連結してH鎖遺伝子を組み入れた。各々のライゲーションは、ライゲーションVer. 2 キット（宝酒造社）を使用した。またアガロースゲルからのDNA断片の抽出には、GeneCleanII Kit（フナコシ社）を用い行った。以上の操作によって得られたプラスミドを大腸菌 HB2151（ファルマシア社）へ導入した。形質転換した大腸菌をアンピシリン含有 2 % Glucose加2xYTプレートに蒔いて一晚培養し、出現したコロニーの中から数個を選び、常法に従ってプラスミドDNAを抽出精製した。適当な制限酵素を用いてこれらプラスミドの切断パターンを調べ、予想されたパターンに一致したものを選び出した。以上の操作によって得られた、抗CD

34抗体の配列を有すScFv抗体を発現するプラスミドをpCANMY10とした。

上記プラスミドでトランスフォームした大腸菌を2%Glucose 添加 100  $\mu$ g/ml アンピシリン添加 S B 培地 (3.5 %バクトトリプトン、2 %バクトイーストエキストラクト、0.5 % NaCl)にて培養した。翌日この一部を10倍量の上記培地に加え、1時間培養した後遠心し、その上清を除き、1 mMのIPTG、100  $\mu$ g/mlアンピシリン添加 S B 培地の等量に換えて、さらに3時間培養した後、菌体をRPAS Purification Module (ファルマシア社)のプロトコールに従って処理することにより、ペリプラズム中の抗体を回収した。得られた抗体粗画分をE t a g 抗体カラム (ファルマシア社)で精製した。このカラムによる精製は添付のプロトコールに従い、付属の試薬を利用して行った。以上の操作により S c F v 抗体精製標品を得た。

#### 〔実施例 2 2〕

実施例 2 1 にて得た抗 C D 34ScFv抗体精製標品を使用し、ヒト C D 34抗原の検出を行った。1x10<sup>7</sup> 個のKG-1a 細胞を0.05% Triton×100(ナカライテスク社)を含む1 mlのPBS(-)で氷上10分間処理して、細胞膜からのタンパク質抽出を行った。使用したKG-1a 細胞は、10%牛胎児血清を含むRPMI-1640 培地で培養した。抽出液10  $\mu$  l をメルカプトエタノール存在下で、3分間沸騰処理した。この液をS D S ポリアクリルアミド電気泳動ゲル (ACI 社)を使用し展開した。この電気泳動は、ゲルに添付の説明書に記載の条件で行った。泳動後ゲル中のタンパク質をPVDF膜(BioRad 社)にトランスファーした。トランスファーは、25mMトリス 192mM グリシン バッファー及び Electrophoresis power Supply-EPS 600 装置 (ファルマシア社)を使用し、100V、1時間でトランスファーした。フィルターは室温で10%スキムミルク入りPBS(-)にて1時間ブロッキングした。このフィルターは、0.05%Tween-20を含むPBS(-)で洗浄後、15  $\mu$ g /ml の1本鎖抗体で1時間反応させた。

次に、このフィルターを洗浄後、2次抗体として抗E-tag 抗体 (ファルマシア

社)を  $5\mu\text{g}/\text{ml}$  で1時間反応させた。さらに、洗浄後、3次抗体として、パーオキシダーゼ標識抗マウスFc抗体を  $5\mu\text{g}/\text{ml}$  で1時間反応させた。このフィルターを洗浄後、1次抗体の結合した電気泳動のバンドは、ECL液(アマシャム社)で発光させ、高感度フィルム(Hyperfilm-ECL: アマシャム社)で検出した。その結果、ポジティブコントロールと同様約120 Kダルトンの位置にCD34分子のバンドが検出された。ポジティブコントロールは、抗HPCA-1抗体(ベクトンディッキンソン社)を1次抗体、パーオキシダーゼ標識抗マウスFc抗体を2次抗体としたフィルターを同様に発色させた。また、ネガティブコントロールとして1次抗体である1本鎖抗体のみを除いて、同様な処理を行った。120Kダルトンのバンドは、検出できなかった。従って、抗CD34 1本鎖抗体は、CD34分子を検出していることを確認した。

### 〔実施例23〕

臍帯血29mlをハンクスバランسد生理食塩水(ギブコ社)で48mlとし、フィコールパック(ファルマシア社)を3mlずつ分注した円心管4本に12mlずつ分注し、800回転/分、20分の条件にて分離し、単核細胞層の細胞を回収した。回収した細胞をハンクス液で洗浄した。その細胞  $2.0 \times 10^7$  個に対し、実施例20で生産したヒトマウスキメラ抗体  $5\mu\text{g}$  を添加し、 $1\mu\text{l}/\text{ml}$  で、氷上にて30分反応させた。それをハンクス液で洗浄後、ダイナビーズ(ダイナル社)抗ヒトIgビーズ  $9 \times 10^6$  個を加え、氷上で1時間反応させた。このダイナビーズの分離操作は、付属のマニュアルに従った。得られた細胞を、14時間ダルベッコMEM培地に10%牛胎児血清で37度5%炭酸ガス雰囲気下で培養した。培養後、ピペッティングすることで細胞とビーズを完全に分離させ、ビーズは、ダイナビーズ付属のマニュアルに従い磁石により除去した。回収した細胞は、一部を使い細胞数を測定して回収細胞数とした。残りの細胞は、抗HPCA-2抗体(ベクトン)で30分氷上で反応させ、冷えた2%牛胎児血清を含む生理食塩水で洗浄し、遠心機で回収した。その細胞を、コールター社のフローサイトメーターでCD34陽性率を測定した。C

D34陽性率をCD34細胞の純度とし、CD34陽性率と、回収細胞数を掛けた細胞数を回収CD34陽性細胞数とした。CD34陽性細胞の回収率は、分離前の陽性細胞数と回収した陽性細胞数から算出した。その結果、CD34陽性細胞は、純度80.4%、回収率45.3%であった。このことから、実施例20で生産したヒトマウスキメラ抗体は、CD34陽性細胞を分離することが示された。

#### 〔実施例24〕

実施例20で生産したヒトマウスキメラ抗体を結合させた抗体カラムをCNBr活性化Sepharose4B(ファルマシア社)を利用して作成した。抗体のSepharose4B ビーズへの結合方法は、添付の取り扱い説明書に従った。4.0 mlのゲルにヒトマウスキメラ抗体液を反応させ、カップリング効率99.5%の効率でアフィニティーゲルを作成した。少量のガラスウールをカラム内下部に固定したガラスカラム(2cm<sub>2</sub>×3cm)をシリコナイズし、このカラムに先に調製した1 mlのゲルを詰めた細胞分離用ゲルカラムを作成した。

臍帯血32mlにシリカ液(株式会社免疫生物研究所)を3 ml加え、37℃で1時間インキュベートした。この細胞懸濁液をハンクスバランスド生理食塩水(ギブコ社)で48mlとし、フィコールパック(ファルマシア社)を3 mlずつ分注した円心管4本にこの懸濁液を12mlずつ分注し、800 回転/分、20分の条件にて分離し、単核細胞層の細胞を回収した。回収した細胞をハンクス液で洗浄した。その細胞 $2.1 \times 10^7$  個を含む1 ml細胞懸濁液を上記抗体カラムに入れ、4℃で弱い攪拌をしつつ1時間反応させた。カラムに、10%牛胎児血清、100 ユニット/ml のペニシリン、100  $\mu$ g/mlのストレプトマイシンを含むハンクスバランスド生理食塩水を流し洗浄した。このカラムを、10%牛胎児血清、100 ユニット/mlのペニシリン、100  $\mu$ g/mlのストレプトマイシンを含むMEM培地(ギブコ社)を2ml 加え炭酸ガス培養器内で37℃で13時間培養した。このカラムを上下させることにより、ゲルを多少強めに攪拌し、カラムから培地を回収した。さらに、カラムに5 mlの10%牛胎児血清、100 ユニット/ml のペニシリン、100  $\mu$ g/mlのストレプトマイ



シンを含むハンクスバランسد生理食塩水を流し、その液も回収した。これらの回収した液中の細胞を遠心により回収した。これらの細胞数を計測した。残りの細胞は、抗HPCA-2抗体（ベクトン）で30分氷上で反応させ、冷えた2%牛胎児を含む生理食塩水で洗浄し、遠心機で回収した。その細胞を、コールター社のフローサイトメーターでCD34陽性率を測定した。CD34陽性率をCD34細胞の純度とし、CD34陽性率と、回収細胞数をかけた細胞数を回収CD34陽性細胞数とした。その結果、純度45.2%、回収率62.6%の結果を得た。このことから、ゲルを詰めたカラム装置からなる造血未分化細胞の分離分離装置が有効であることを確認した。

〔実施例25〕

臍帯血29mlをハンクスバランسد生理食塩水（ギブコ社）で48mlとし、フィコールパック（ファルマシア社）を3mlずつ分注した円心管4本に12mlずつ分注し、800回転/分、20分の条件にて分離し、単核細胞層の細胞を回収した。回収した細胞をハンクス液で洗浄した。その細胞  $2.0 \times 10^7$  個に対し、実施例21で生産した1本鎖抗体25 $\mu$ gを添加し、5 $\mu$ l/mlで、氷上にて1時間反応させた。それをハンクス液で洗浄後、抗Etag（ファルマシア社）抗体で30分反応させた。洗浄後、ダイナビーズ（ダイナル社）抗マウスIgG ビーズ  $9 \times 10^6$  個を加え、氷上で1時間反応させた。付属のダイナビーズのマニュアルに従い、ビーズに吸着した細胞と共に、このビーズを分離した。得られた細胞を、10%牛胎児血清を加えたダルベッコ MEM培地で5%炭酸ガス雰囲気下で37℃で12時間培養した。培養後、ピペッティングする事で細胞とビーズを完全に分離させ、ビーズは、ダイナビーズ付属のマニュアルに従い磁石により除去した。回収した細胞は、一部を使い細胞数を測定して回収細胞数とした。残りの細胞は、抗HPCA-2抗体（ベクトン）で30分氷上で反応させ、冷えた2%牛胎児血清を含む生理食塩水で洗浄し、遠心機で回収した。その細胞を、コールター社のフローサイトメーターでCD34陽性率を測定した。CD34陽性率をCD34細胞の純度とし、CD34陽性率と、回収細胞

数をかけた細胞数を回収CD34陽性細胞数とした。その結果、純度36.1%、回収率35.3%であった。このことから、実施例21で生産で生産した1本鎖抗体した抗体は、CD34陽性細胞を分離することが示された。

#### 〔実施例26〕

実施例21で生産した1本鎖抗体を結合させた抗体カラムをCNBr活性化 Sepharose4B（ファルマシア社）を利用して作製した。抗体のSepharose4B ビーズへの結合方法は、添付の取り扱い説明書に従った。4.0ml のゲルに1本鎖抗体液を反応させ、カップリング効率99.0%の効率でアフィニティーゲルを作製した。少量のガラスウールをカラム内下部に固定したガラスカラム(2cm<sub>2</sub> × 4 cm) をシリコナイズし、このカラムに先に調製した1mlのゲルを詰めたゲルカラム細胞分離装置を作製した。

臍帯血28mlにシリカ液（株式会社免疫生物研究所）を3ml加え、37℃で1時間インキュベートした。この細胞懸濁液をハンクスバランスド生理食塩水（ギブコ社）で48mlとし、フィコールパック（ファルマシア社）を3mlずつ分注した円心管4本にこの懸濁液を12mlずつ分注し、800 回転/分、20分の条件にて分離し、単核細胞層の細胞を回収した。回収した細胞をハンクス液で洗浄した。その細胞  $1.8 \times 10^7$  個を含む1ml細胞懸濁液を上記抗体カラムに入れ、1時間4度で弱い攪拌をしつつ反応させた。カラムに、10%牛胎児血清、100 ユニット/mlのペニシリン、100  $\mu$ g/ml のストレプトマイシンを含むハンクスバランスド生理食塩水を流し洗浄した。このカラムを、10%牛胎児血清、100 ユニット/mlのペニシリン、100  $\mu$ g/mlのストレプトマイシンを含むMEM 培地（ギブコ社）を2ml加え炭酸ガス培養器内で37℃で13時間培養した。このカラムを上下させることにより、ゲルを多少強めに攪拌し、カラムから培地を回収した。さらに、カラムに5mlの10%牛胎児血清、100 ユニット/mlのペニシリン、100  $\mu$ g/mlのストレプトマイシンを含むハンクスバランスド生理食塩水を流し、その液も回収した。これらの回収した液中の細胞を遠心により回収した。これらの細胞数を計測した。残りの

細胞は、抗HPCA-2抗体（ベクトン）で30分氷上で反応させ、冷えた2%牛胎児を含む生理食塩水で洗浄し、遠心機で回収した。その細胞を、コールター社のフローサイトメーターでCD34陽性率を測定した。CD34陽性率をCD34細胞の純度とし、CD34陽性率と、回収細胞数を掛けた細胞数を回収CD34陽性細胞数とした。その結果、純度52.8%、回収率41.0%の結果を得た。このことから、ゲルを詰めたカラム装置からなる造血未分化細胞の分離装置が有効であることを確認した。

#### 〔実施例27〕

実施例21で作成したpCANMY10ベクターを改良し、水不溶性担体への結合性を向上しうる抗体を作成した。1本鎖抗体のカルボキシル末端にあるE-tag 配列に続いてアミノ酸リシン残基を3個導入した。pCANMY10ベクターの制限酵素部位を利用し、PCR法でリシン残基を含む配列を導入した。その配列を配列表4に示した。

このベクターを大腸菌HB2151細胞に導入し、実施例21と同様に1本鎖抗体を作成した。

得られた抗体を、1本鎖抗体を結合させた抗体カラムをCNBr活性化Sepharose4B（ファルマシア社製）を利用して作製した。抗体のSepharose4B ビーズへの結合方法は、添付の取り扱い説明書に従った。4.0ml のゲルに1本鎖抗体液を反応させ、アフィニティーゲルを作製した。少量のガラスウールをカラム内下部に固定したガラスカラム（2cm<sub>2</sub>×3cm）をシリコナイズし、このカラムに先に調製した1mlのゲルを詰めたゲルカラム細胞分離装置を作製した。

臍帯血32mlにシリカ液（株式会社免疫生物研究所）を3ml加え、1時間37度でインキュベートした。この細胞懸濁液をハンクスバランسد生理食塩水（ギブコ社製）で48mlとし、フィコールパック（ファルマシア社製）を3mlずつ分注した円心管4本にこの懸濁液を12mlずつ分注し、800回転/分、20分の条件にて分離し、単核細胞層の細胞を回収した。回収した細胞をハンクス液で洗浄した。その

細胞  $2.1 \times 10^7$  個を含む 1 ml 細胞懸濁液を上記抗体カラムに入れ、1 時間 4 度で弱い攪拌をしつつ反応させた。カラムに、10% 牛胎児血清、100 ユニット/ml のペニシリン、100 マイクログラム/ml のストレプトマイシンを含むハンクスバランス生理食塩水を流し洗浄した。このカラムを、10% 牛胎児血清、100 ユニット/ml のペニシリン、100 マイクログラム/ml のストレプトマイシンを含む MEM 培地（ギブコ社製）を 2 ml 加え 37 度炭酸ガス培養器内で 14 時間培養した。このカラムを上下させることにより、ゲルを多少強めに攪拌し、カラムから培地を回収した。さらに、カラムに 5 ml の 10% 牛胎児血清、100 ユニット/ml のペニシリン、100 マイクログラム/ml のストレプトマイシンを含むハンクスバランス生理食塩水を流し、その液も回収した。これらの回収した液中の細胞を遠心により回収した。これらの細胞数を計測した。残りの細胞は、抗 HPCA-2 抗体（ベクトン）で 30 分氷上で反応させ、冷えた 2% 牛胎児を含む生理食塩水で洗浄し、遠心機で回収した。その細胞を、コールター社のフローサイトメーターで CD34 陽性率を測定した。CD34 陽性率を CD34 細胞の純度とし、CD34 陽性率と、回収細胞数を掛けた細胞数を回収 CD34 陽性細胞数とした。その結果、純度 71.0%、回収率 52.0% の結果を得た。このことから、ゲルを詰めたカラム装置からなる造血未分化細胞の分離装置が有効であることを確認すると共に、カルボキシル末端にリシン残基を導入した組換え抗体がより効率よく、細胞を分離しうることが示された。

#### 産業上の利用の可能性

本発明により、CD4 陽性細胞及び CD34 陽性細胞の分離を特異的かつ効率よく行うことが可能となった。本発明は、自己免疫疾患などの治療を目的とした自己反応性抗原受容体を持った T リンパ球の捕集、骨髓移植用細胞からのリンパ球除去などの分野、さらに本発明は、白血病などの医療を目的とした造血未分化細胞の捕集、骨髓移植用細胞からのリンパ球除去などの分野において有効である。

#### 寄託された微生物への言及

イ. 当該微生物を寄託した寄託機関の名称及びあて名

寄託機関：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1-3

ロ. 寄託機関に寄託した日付

平成10年(1998年)5月14日

ハ. 寄託機関に寄託について付した受託番号

FERM BP-6729

なお、本寄託は平成10年(1998年)5月14日に寄託された原寄託(受託番号：微工研菌寄第P-16807号)より、平成11年5月21日にブタペスト条約に基づく寄託に移管されたものである。

## 請 求 の 範 囲

1. キメラ抗体、1本鎖抗体、またはそれらを組合せた抗体を用いた細胞分離装置。
2. CD4分子に結合するキメラ抗体、1本鎖抗体、またはそれらを組合せた抗体を用いたCD4陽性細胞分離装置。
3. H鎖可変領域のCDR-1が配列表配列番号1、CDR-2が配列番号2、CDR-3が配列番号3で表されるアミノ酸配列であり、L鎖可変領域のCDR-1が配列番号4、CDR-2が配列番号5、CDR-3が配列番号6で表されるアミノ酸配列であり、Fc領域がヒト型であるキメラ抗体を用いたCD4陽性細胞分離装置。
4. H鎖可変領域のCDR-1が配列表配列番号1、CDR-2が配列番号2、CDR-3が配列番号3で表されるアミノ酸配列であり、L鎖可変領域のCDR-1が配列番号4、CDR-2が配列番号5、CDR-3が配列番号6で表されるアミノ酸配列である1本鎖抗体を用いたCD4陽性細胞分離装置。
5. CD34分子に結合するキメラ抗体、1本鎖抗体、またはそれらを組合せた抗体を用いたCD34陽性細胞分離装置。
6. H鎖可変領域のCDR-1が配列表配列番号43、CDR-2が配列番号44、CDR-3が配列番号45で表されるアミノ酸配列であり、L鎖可変領域のCDR-1が配列番号46、CDR-2が配列番号47、CDR-3が配列番号48で表されるアミノ酸配列であり、Fc領域がヒト型である抗体を用いたヒトCD34陽性細胞分離装置。
7. H鎖可変領域のCDR-1が配列表配列番号43、CDR-2が配列番号44、CDR-3が配列番号45で表されるアミノ酸配列であり、L鎖可変領域のCDR-1が配列番号46、CDR-2が配列番号47、CDR-3が配列番号48で表されるアミノ酸配列である1本鎖抗体を用いたヒトCD34陽性細胞分離装置。
8. 抗体のアミノ酸配列のC末端、N末端、またはそれらの両者に、塩基性アミノ酸または酸性アミノ酸を含むアミノ酸配列を付加して用いた請求項1から7

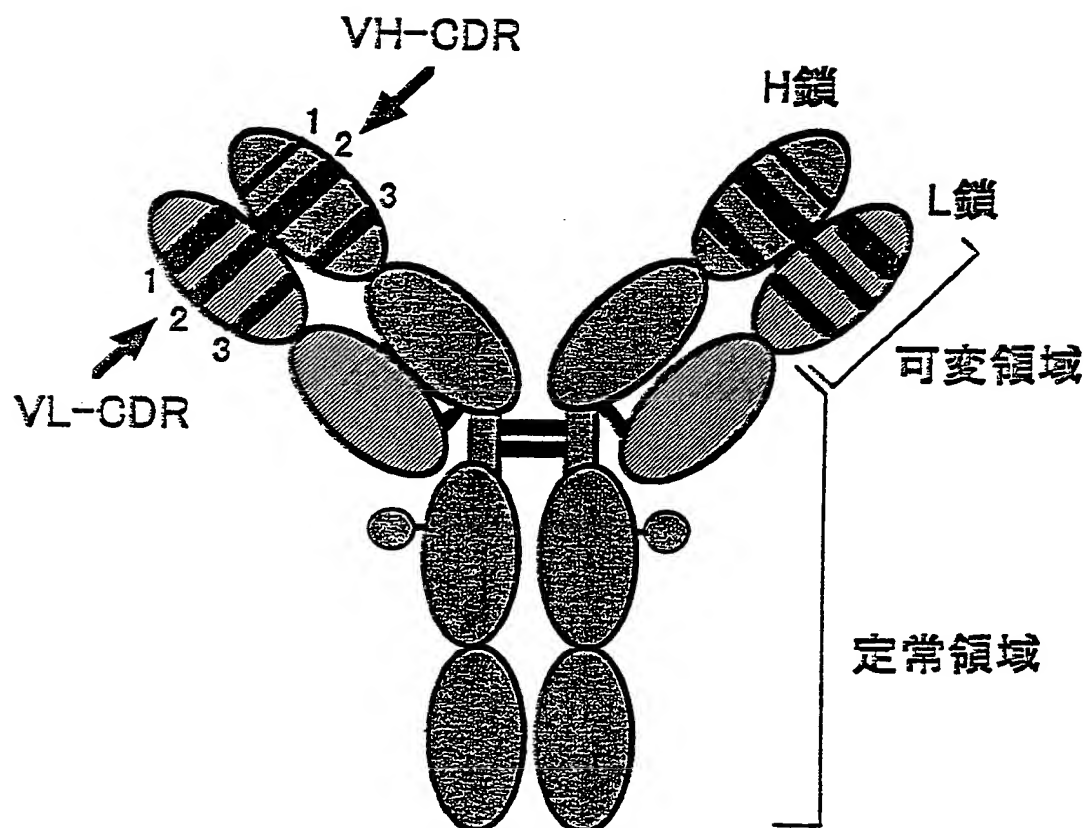
のいずれかに記載の細胞分離装置。

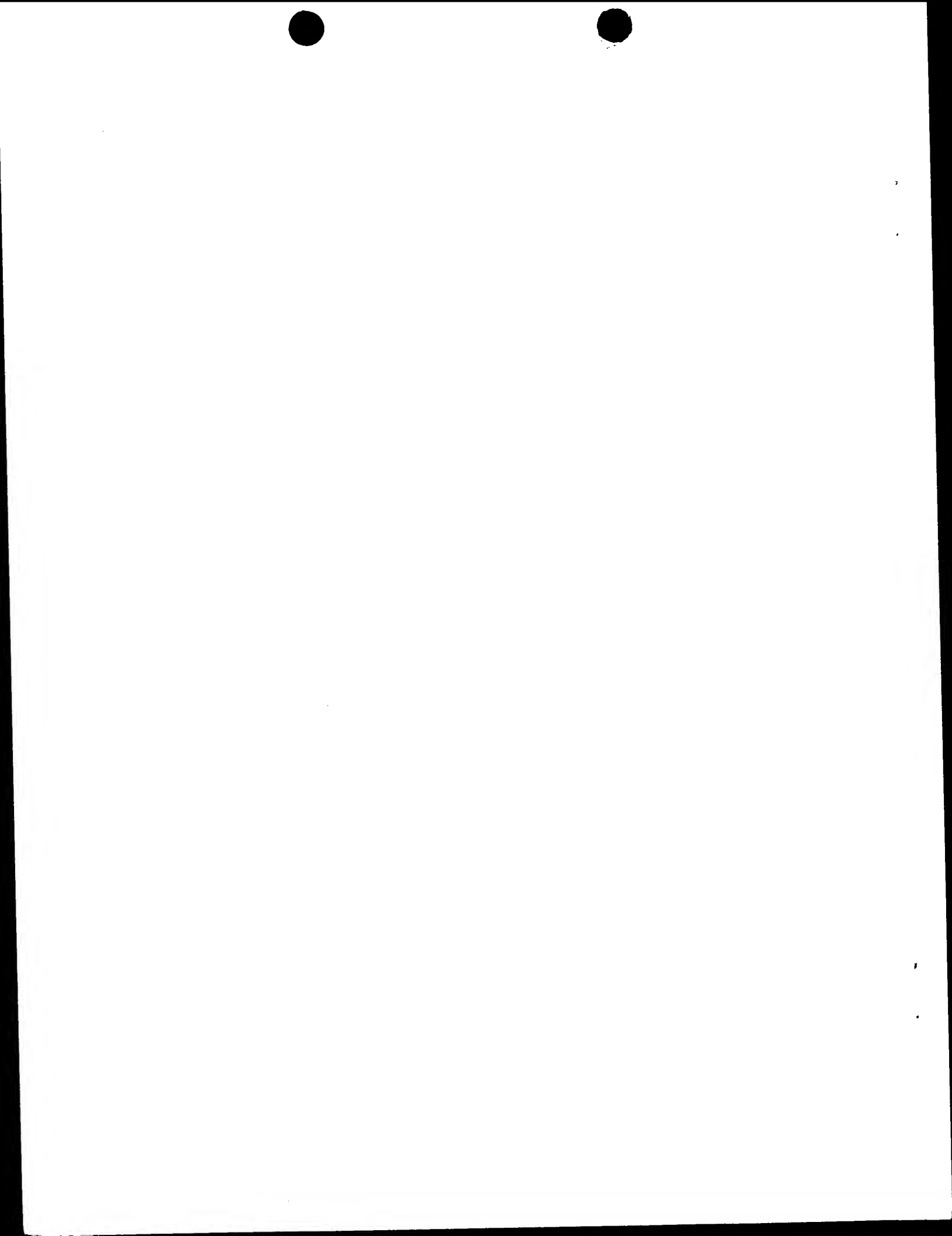
9. ポリプロピレン不織布にハロアセトアミノメチル化剤を反応させてなる活性基にキメラ抗体もしくは一本鎖抗体、またはそれらを組み合わせた抗体を結合させた請求項 1 から 8 の細胞分離装置。
10. キメラ抗体、1 本鎖抗体、またはそれらを組合せた抗体を用いた細胞分離または検出方法。
11. C D 4 分子に結合するキメラ抗体、1 本鎖抗体、またはそれらを組み合わせた抗体を用いたヒト C D 4 陽性細胞の分離または検出方法。
12. H 鎖可変領域の CDR-1 が配列表配列番号 1、CDR-2 が配列番号 2、CDR-3 が配列番号 3 で表されるアミノ酸配列であり、L 鎖可変領域の CDR-1 が配列番号 4、CDR-2 が配列番号 5、CDR-3 が配列番号 6 で表されるアミノ酸配列であり、Fc 領域がヒト型であるキメラ抗体を用いたヒト C D 4 陽性細胞の分離または検出方法。
13. H 鎖可変領域の CDR-1 が配列表配列番号 1、CDR-2 が配列番号 2、CDR-3 が配列番号 3 で表されるアミノ酸配列であり、L 鎖可変領域の CDR-1 が配列番号 4、CDR-2 が配列番号 5、CDR-3 が配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を含有する 1 本鎖抗体を用いたヒト C D 4 陽性細胞の分離または検出方法。
14. C D 34 分子に結合するキメラ抗体、1 本鎖抗体、またはそれらを組合せた抗体を用いたヒト C D 34 陽性細胞の分離または検出方法。
15. H 鎖可変領域の CDR-1 が配列表配列番号 43、CDR-2 が配列番号 44、CDR-3 が配列番号 45 で表されるアミノ酸配列であり、L 鎖可変領域の CDR-1 が配列番号 46、CDR-2 が配列番号 47、CDR-3 が配列番号 48 で表されるアミノ酸配列であり、F c 領域がヒト型である抗体を用いたヒト C D 34 陽性細胞の分離または検出方法。
16. H 鎖可変領域の CDR-1 が配列表配列番号 43、CDR-2 が配列番号 44、CDR-3 が配列番号 45 で表されるアミノ酸配列であり、L 鎖可変領域の CDR-1 が配列番号

- 46、CDR-2 が配列番号、47、CDR-3 が配列番号48で表されるアミノ酸配列を含有する 1 本鎖抗体を用いたヒト C D 34陽性細胞分離または検出方法。
17. 抗体のアミノ酸配列の C 末端、N 末端またはそれらの両者に、塩基性アミノ酸または酸性アミノ酸を含むアミノ酸配列を付加して用いた請求項 1 0 から 1 6 のいずれかに記載の細胞分離または検出方法。
18. H 鎖可変領域の CDR-1、CDR-2 および CDR-3がそれぞれ配列表配列番号 1、2 および 3 に記載のアミノ酸配列であり、CD4抗原に対して親和性を有する抗体。
19. L 鎖可変領域の CDR-1、CDR-2 および CDR-3がそれぞれ配列表配列番号 4、5 および 6 に記載のアミノ酸配列であり、CD4抗原に対して親和性を有する抗体。
20. 受託番号がFERM BP-6729であるハイブリドーマ4H5 により産生される、CD 4 抗原に対するモノクローナル抗体。
21. 請求項 1 8 から 2 0 のいずれかに記載の抗体をコードする核酸。
22. 配列表配列番号 7 および配列番号 8 に記載の塩基配列を含有する、請求項 2 1 に記載の核酸。
23. 請求項 2 1 または 2 2 に記載の核酸を用いた抗体の生産方法。
24. 請求項 2 3 の方法によって得ることができ、CD4抗原に対して親和性を有する組換え抗体。
25. 抗体のFc領域がヒト型である請求項 2 4 に記載の組換え抗体。
26. 抗体が 1 本鎖抗体である請求項 2 4 に記載の組換え抗体。
27. 請求項 1 8 から 2 0 のいずれかに記載の抗体と、医薬的に許容しうる担体とからなる医薬組成物。
28. 請求項 2 4 から 2 6 のいずれかに記載の組換え抗体と、医薬的に許容しうる担体とからなる医薬組成物。

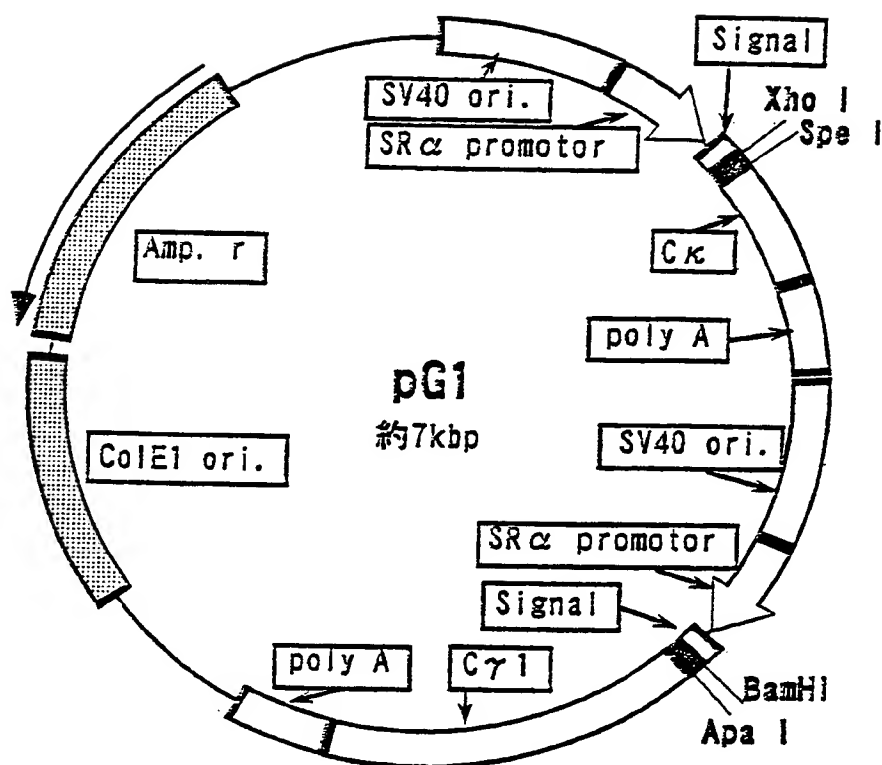


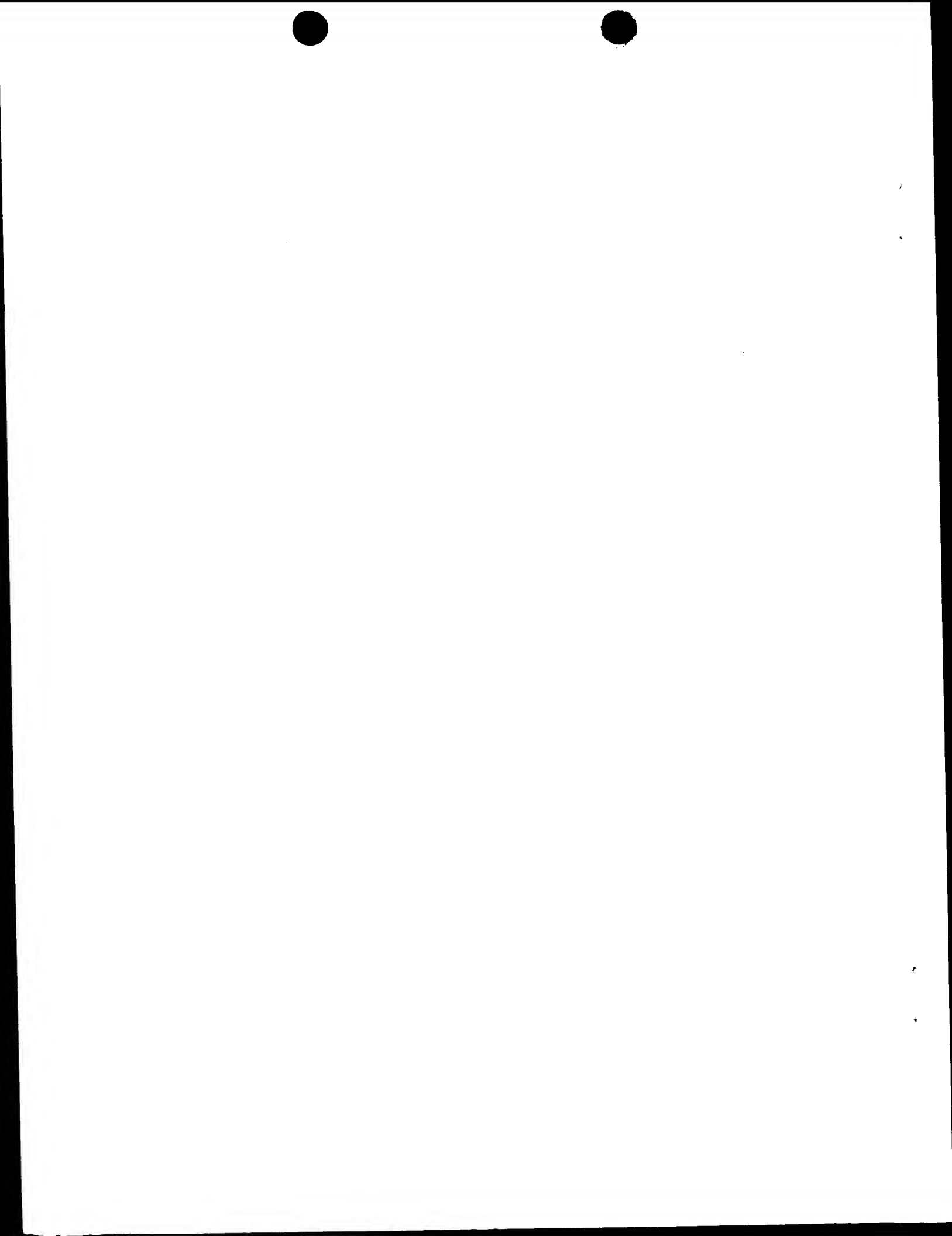
第1図





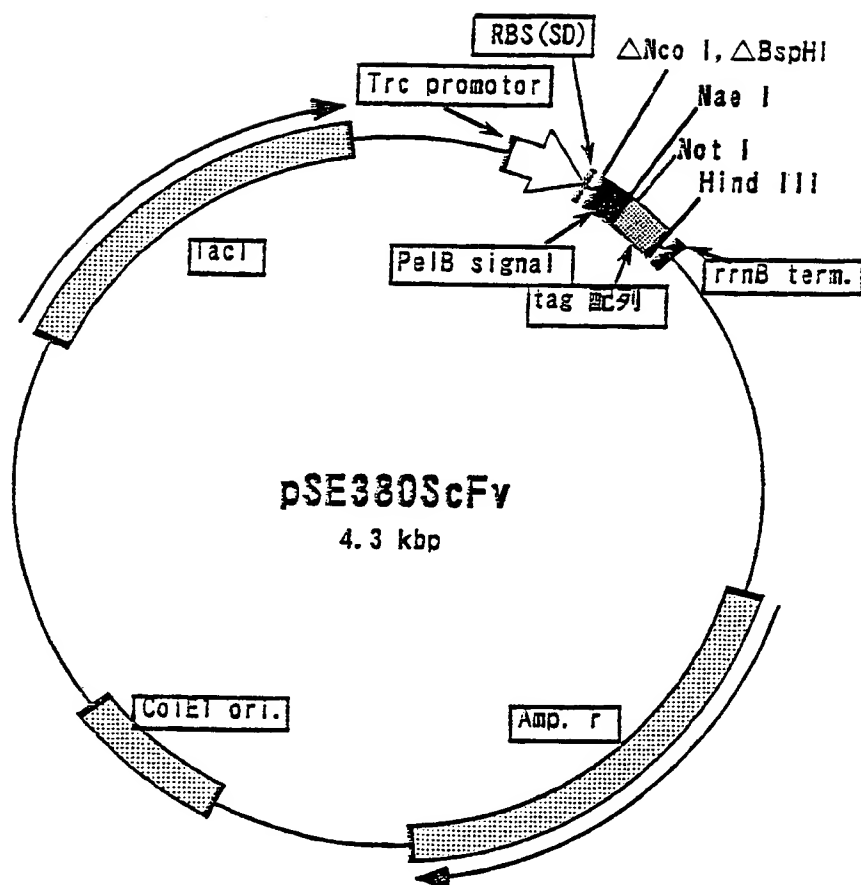
第2図





3 / 6

第3図

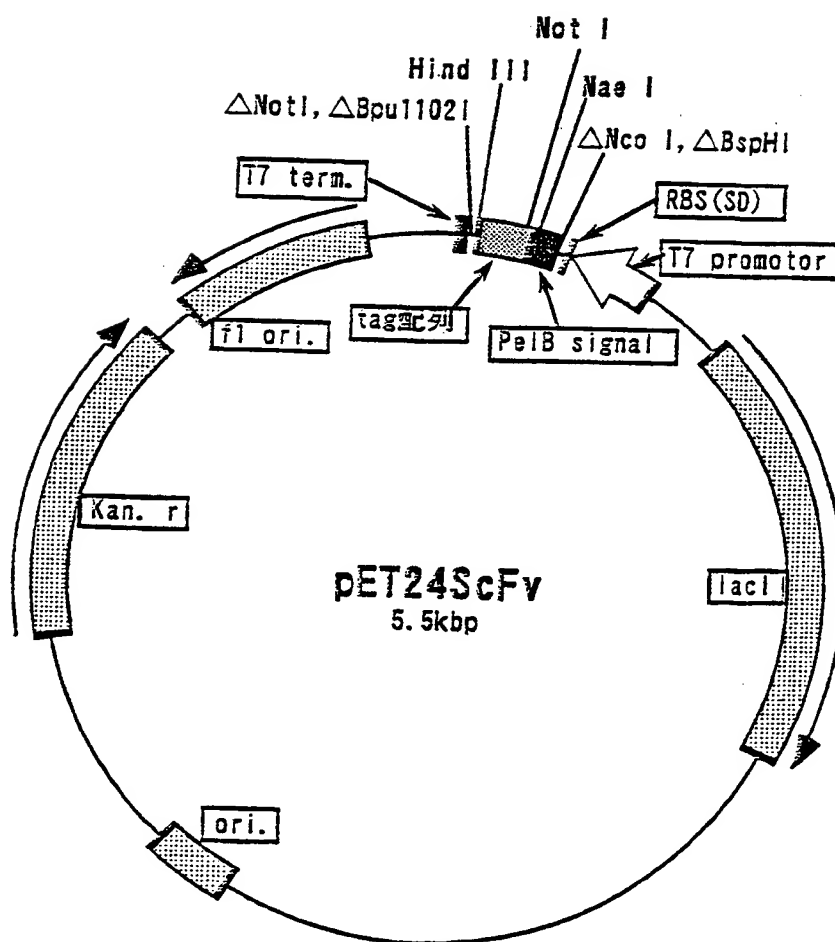


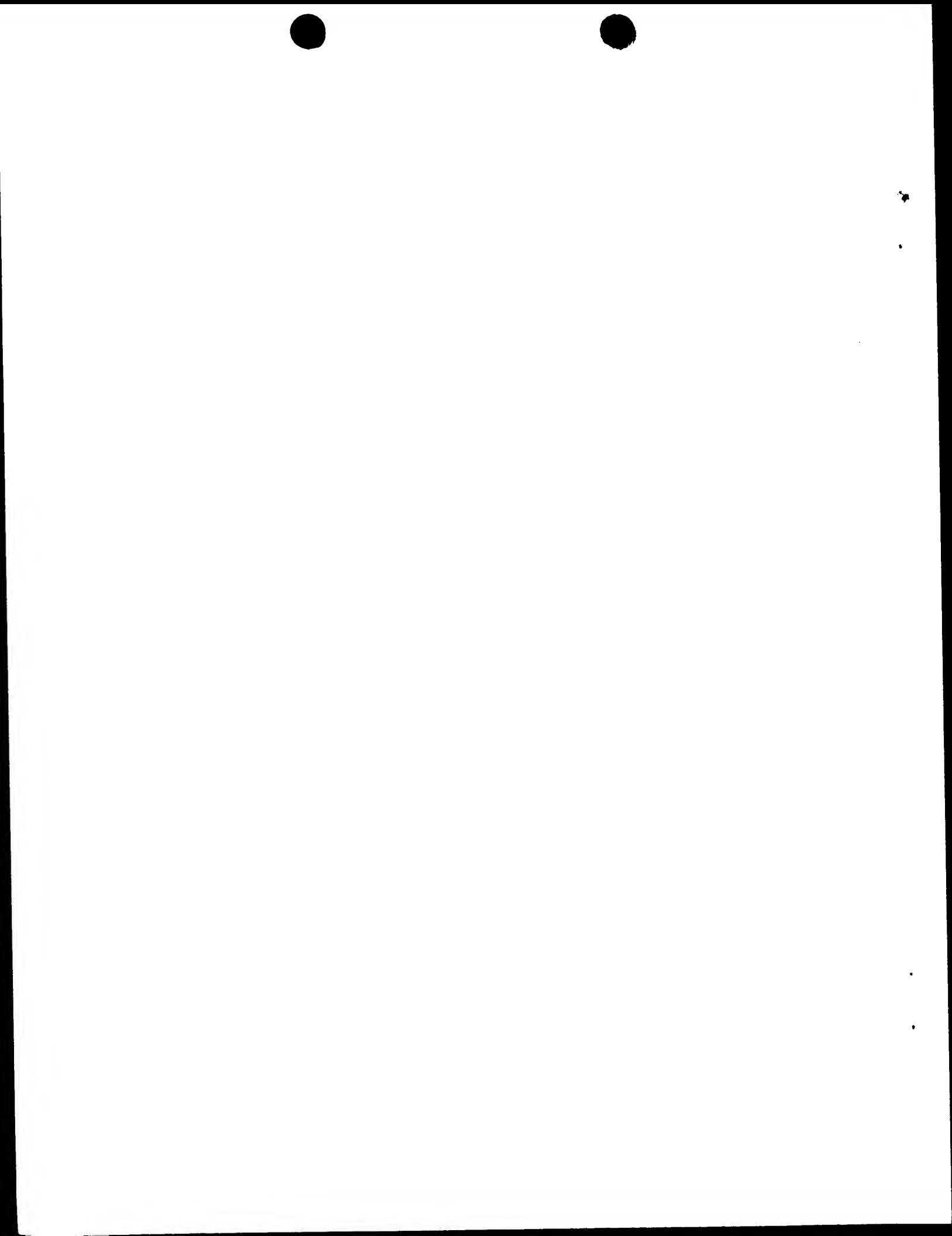
2  
1  
1  
1

1  
1  
1  
1

4 / 6

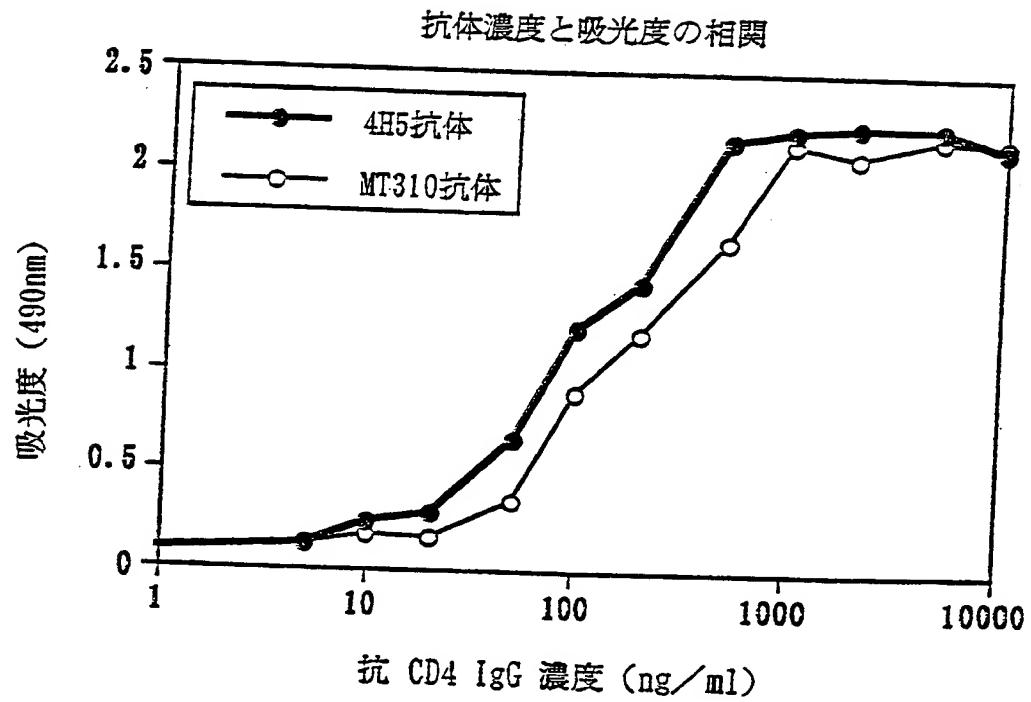
第4図

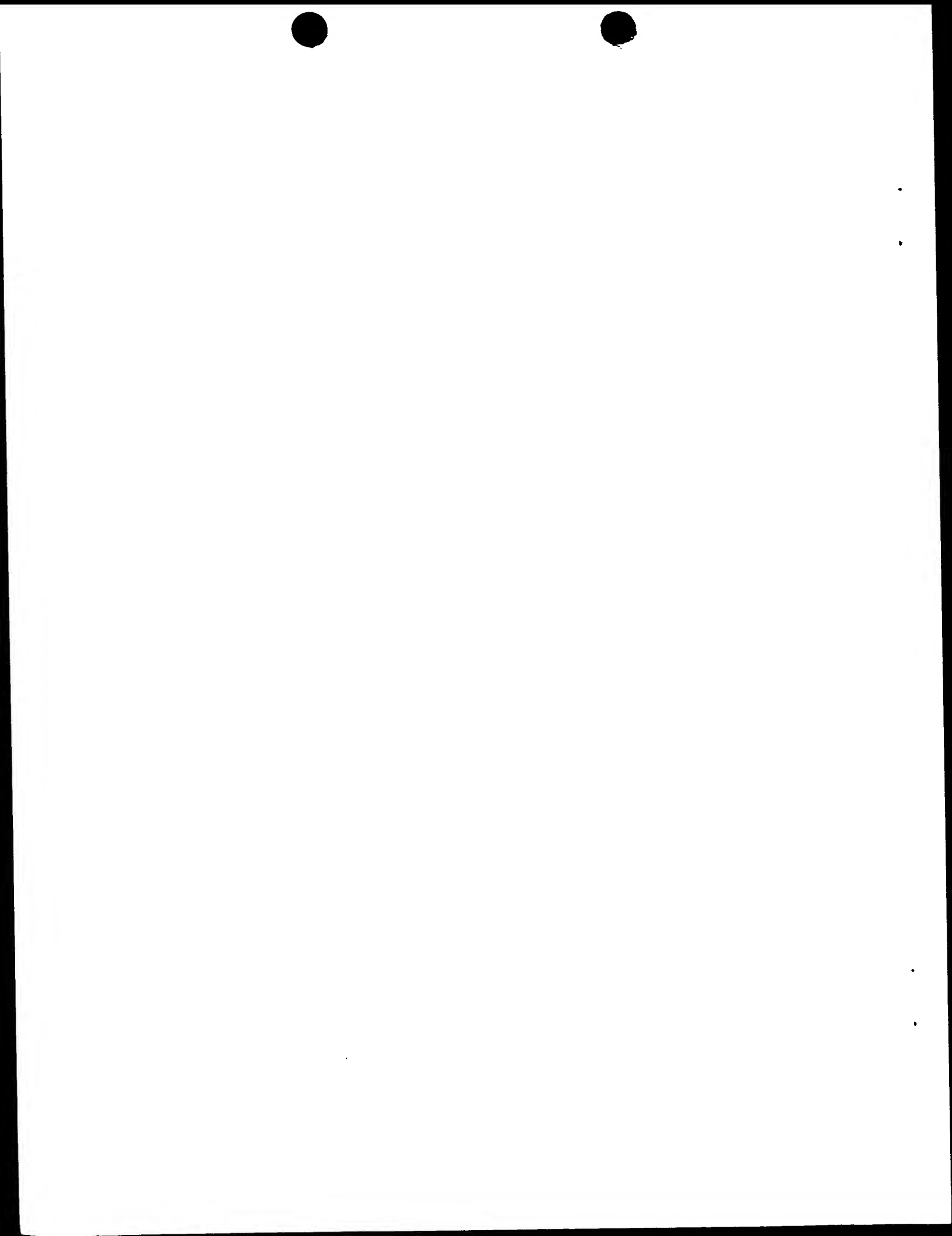






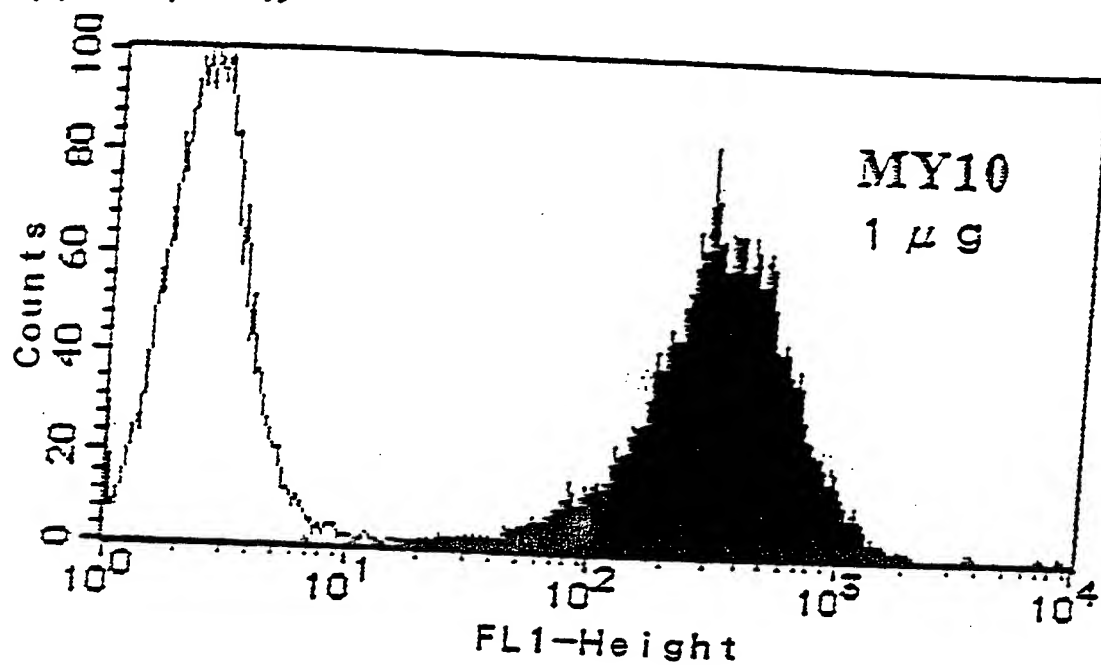
第5図



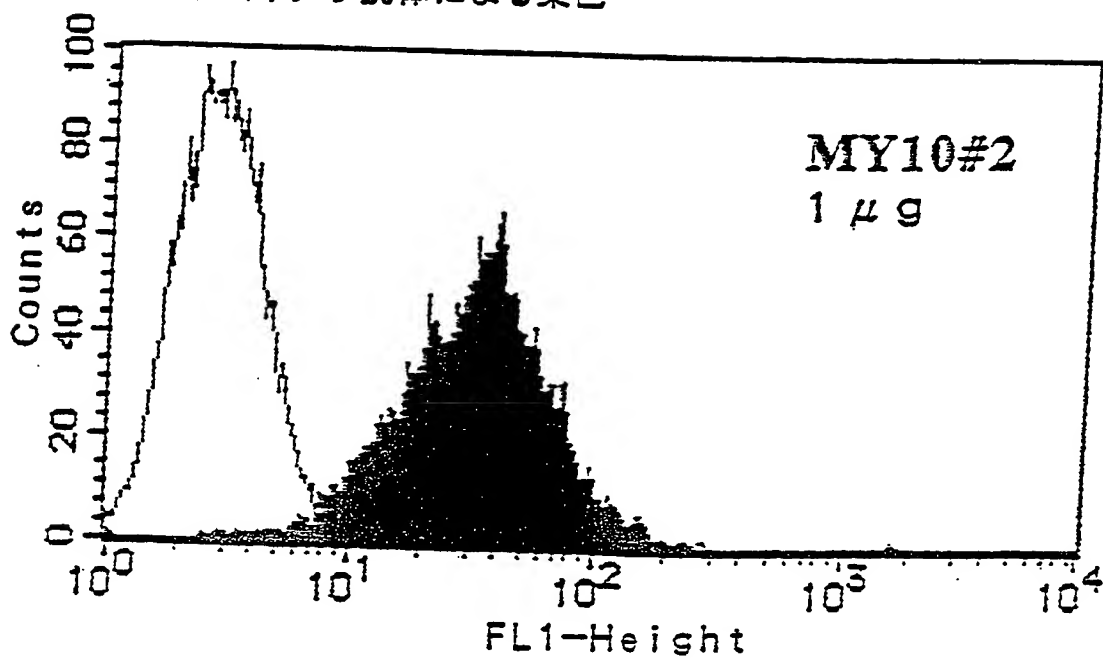


## 第6図

(1) コントロール



(2) ヒトマウスキメラ抗体による染色





〔配列表〕

## SEQUENCE LISTING

<110> ASAHIKASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA  
ASAHI MEDICAL CO., LTD.

<120> Separating apparatus of cells and separating method

<130> ASAHI-1

<150> JP 10/159957  
JP 10/163023

<151> 1998-5-25  
1998-5-26

<160> 48

<210> 1

<211> 5

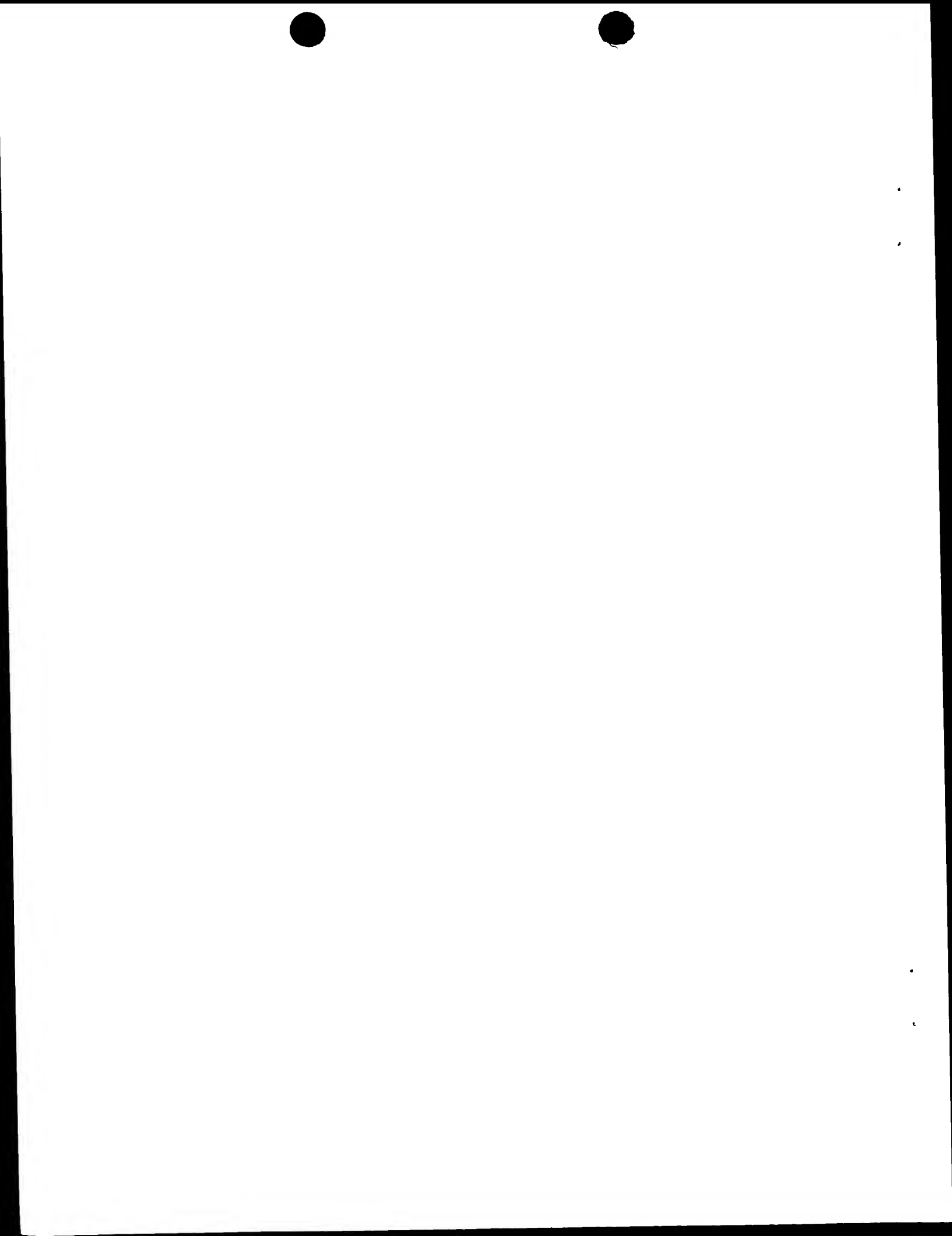
<212> PRT

<213> mouse

<400> 1

Asp Tyr Val Ile Asn

1 5



<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> mouse

<400> 2

Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ala Tyr Tyr Asn Glu Met Phe Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> mouse

<400> 3

Arg Gly Thr Gly Thr Gly Phe Ala Tyr

1

5

<210> 4

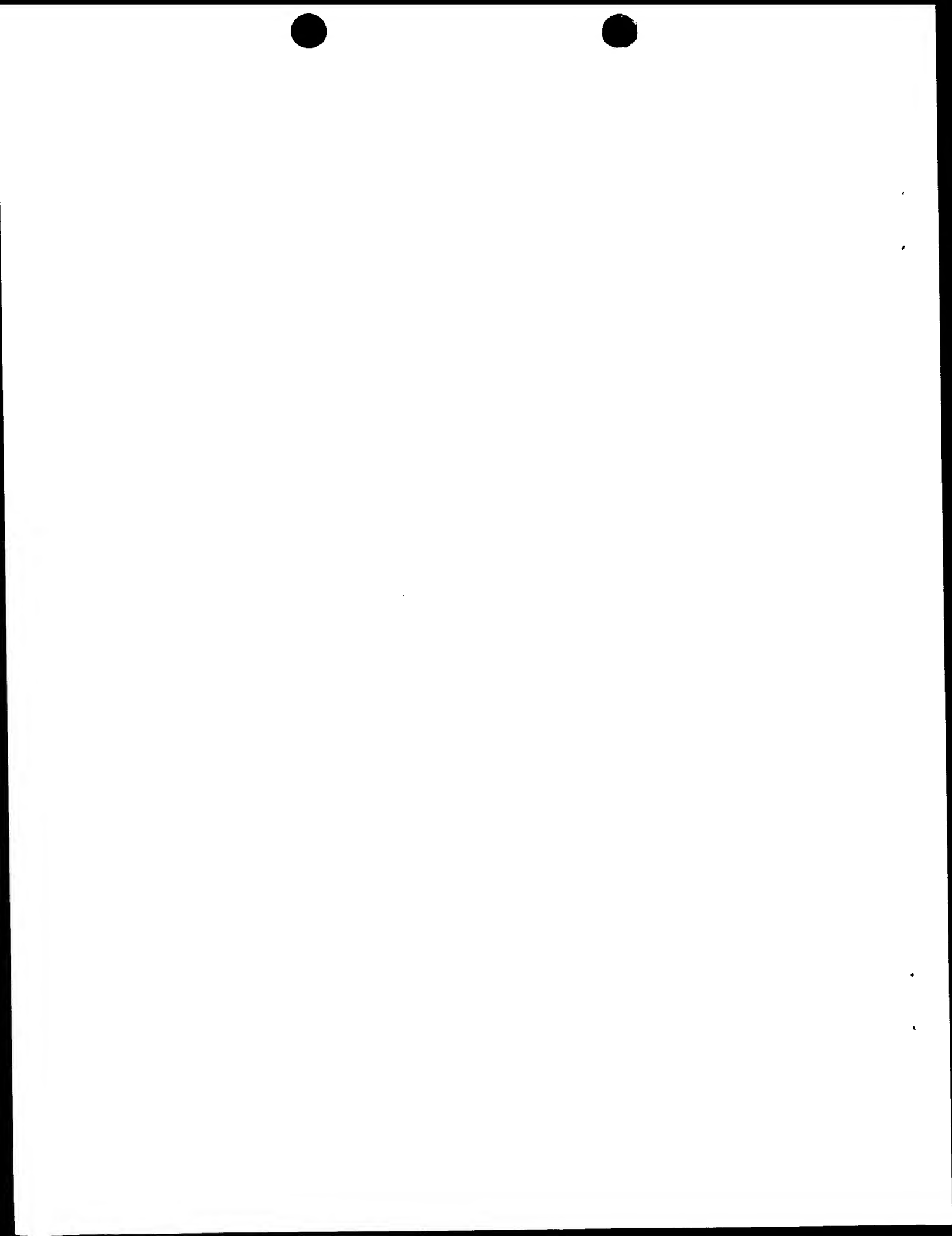
<211> 15

<212> PRT

<213> mouse

<400> 4

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn





3 / 3 3

1

5

10

15

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; mouse

&lt;400&gt; 5

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1

5

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; mouse

&lt;400&gt; 6

Gln Gln Ser Ser Glu Asp Pro Pro Thr

1

5

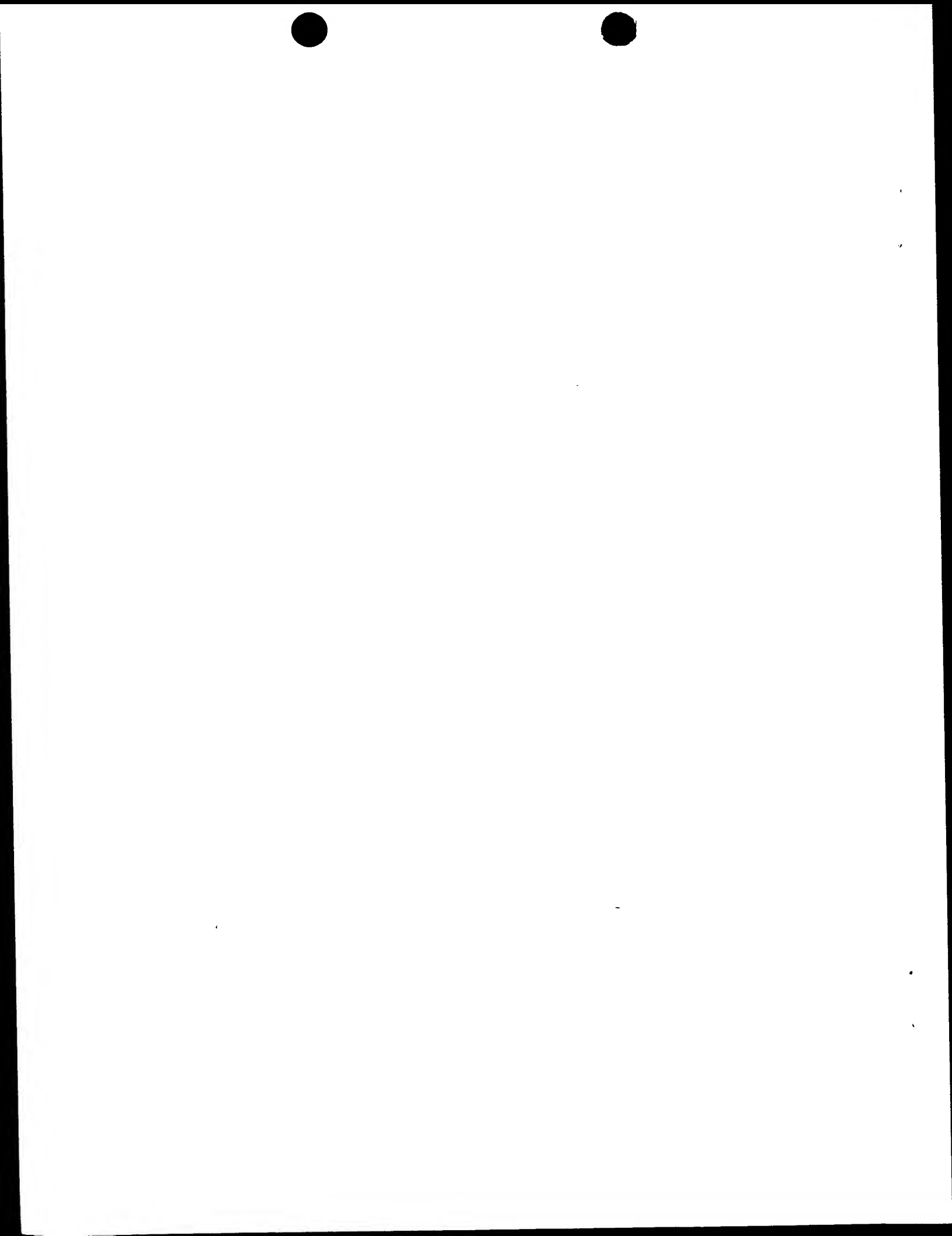
&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 330

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; mouse

&lt;400&gt; 7



CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT 48  
 Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala  
 1 5 10 15  
 TCT GGA TAC ACA TTC ACT GAC TAT GTT ATA AAC TGG TTG AAC CAG AGA 96  
 Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Ile Asn Trp Leu Asn Gln Arg  
 20 25 30  
 ACT GGA CAG GGC CTT GAG TGG ATT GGA GAG ATT TAT CCT GGA AGT GGT 144  
 Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly  
 35 40 45  
 AGT GCT TAC TAC AAT GAG ATG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA 192  
 Ser Ala Tyr Tyr Asn Glu Met Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala  
 50 55 60  
 GAC AAA TCC TCC AAC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT 240  
 Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser  
 65 70 75 80  
 GAG GAC TCT GCG GTC TAT TTC TGT GCA AGA CGC GGA ACT GGG ACG GGG 288  
 Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Gly Thr Gly Thr Gly  
 85 90 95  
 TTT GCT TAC TGG GGC CGA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA 330  
 Phe Ala Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 100 105 110

<210> 8  
 <211> 309  
 <212> DNA  
 <213> mouse



&lt;400&gt; 8

GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC AAG 48  
 Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys  
 1 5 10 15  
 GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAC 96  
 Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr  
 20 25 30  
 CAA CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT GCT GCA TCC 144  
 Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser  
 35 40 45  
 AAT CTA GAA TCT GGG ATC CCA GCC AGG TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG 192  
 Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 50 55 60  
 ACA GAC TTC ACC CTC AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA 240  
 Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala  
 65 70 75 80  
 ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AGT GAG GAT CCT CCG ACG TTC GGT GGA 288  
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly  
 85 90 95  
 GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA 309  
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 925

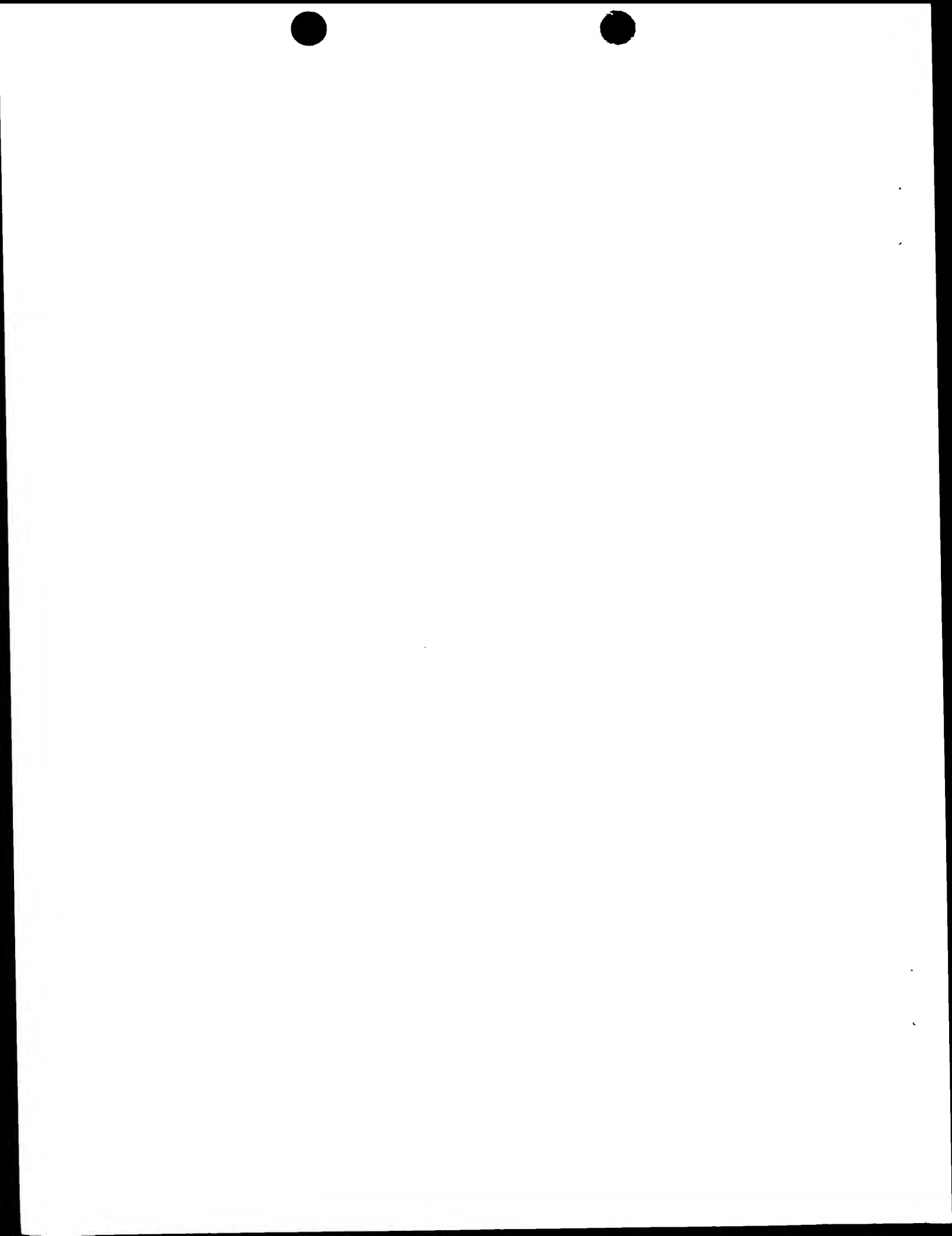


&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; mouse

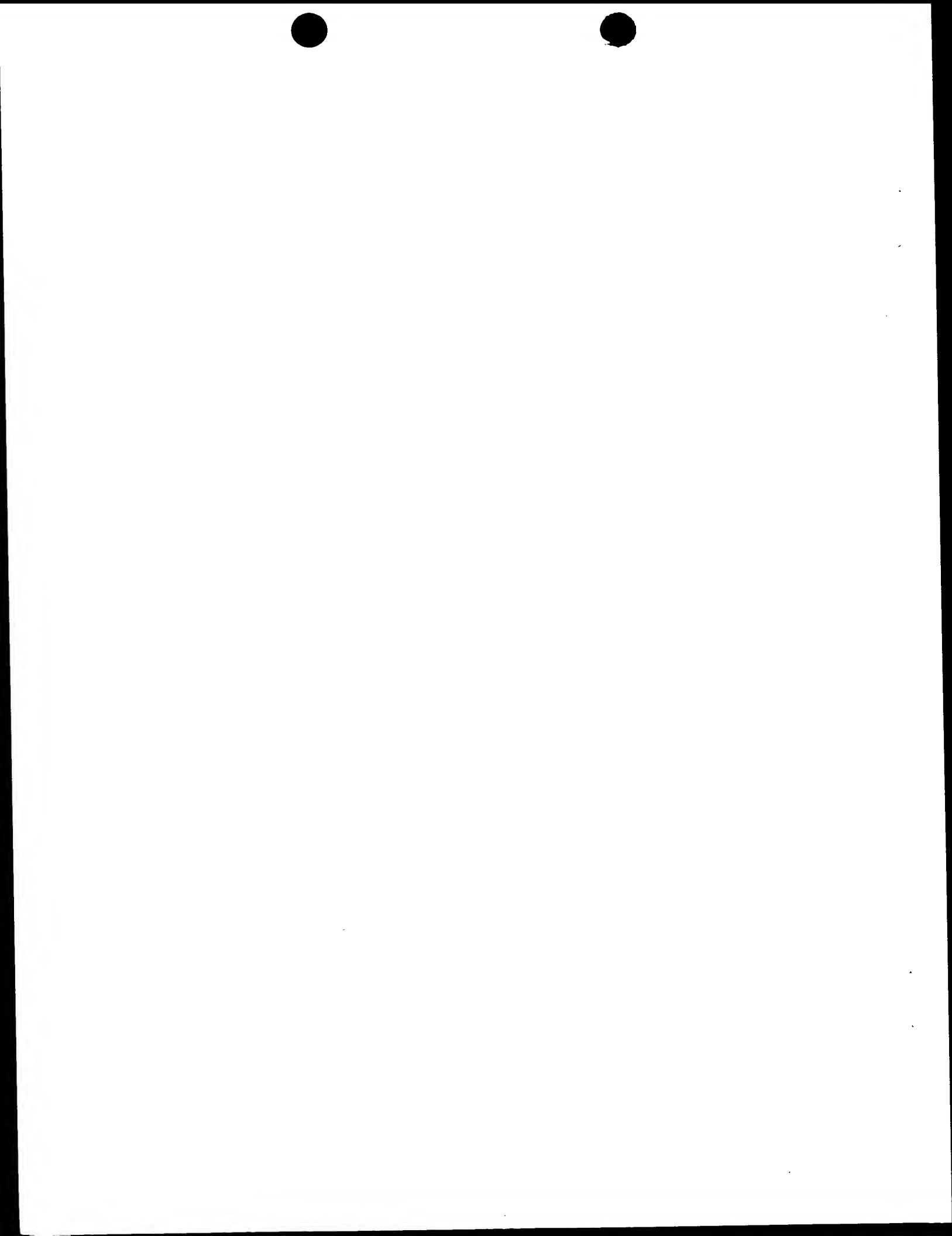
&lt;400&gt; 9

ATG AAA TAC CTG CTG CCG ACC GCT GCT GCT GGT CTG CTG CTC CTC GCG	48
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala	
1 5 10 15	
GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCT	96
Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser	
20 25 30	
TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC	144
Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser	
35 40 45	
CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAC CAA CAG	192
Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln	
50 55 60	
AAA CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT GCT GCA TCC AAT CTA	240
Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu	
65 70 75 80	
GAA TCT GGG ATC CCA GCC AGG TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC	288
Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp	
85 90 95	
TTC ACC CTC AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT	336
Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr	
100 105 110	
TAC TGT CAG CAA AGT AGT GAG GAT CCT CCG ACG TTC GGT GGA GGC ACC	384





Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr  
 115 120 125  
 AAG CTG GAA ATC AAA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCC GGA 432  
 Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 130 135 140  
 GGT GGC GGA TCG CAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG 480  
 Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val  
 145 150 155 160  
 AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACA 528  
 Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr  
 165 170 175  
 TTC ACT GAC TAT GTT ATA AAC TGG TTG AAC CAG AGA ACT GGA CAG GGC 576  
 Phe Thr Asp Tyr Val Ile Asn Trp Leu Asn Gln Arg Thr Gly Gln Gly  
 180 185 190  
 CTT GAG TGG ATT GGA GAG ATT TAT CCT GGA AGT GGT AGT GCT TAC TAC 624  
 Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ala Tyr Tyr  
 195 200 205  
 AAT GAG ATG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC 672  
 Asn Glu Met Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser  
 210 215 220  
 AAC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG 720  
 Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala  
 225 230 235 240  
 GTC TAT TTC TGT GCA AGA CGC GGA ACT GGG ACG GGG TTT GCT TAC TGG 768  
 Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Gly Thr Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp  
 245 250 255



GGC CGA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA GCG GCC GCA GAC TAC AAG 816  
 Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ala Ala Asp Tyr Lys

260

265

270

GAT GAC GAT GAC AAA GGC TCG AGC GAG CAG AAG CTG ATC AGC GAA GAG 864  
 Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ser Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu

275

280

285

GAT CTG GGC TCG AGG TCG ACC CAC CAT CAT CAT CAC CAC GGG TCG ACC 912  
 Asp Leu Gly Ser Arg Ser Thr His His His His His His Gly Ser Thr

290

295

300

AAA TGA TAA GCT T

925

Lys

305

<210> 10

<211> 925

<212> DNA

<213> mouse

<400> 10

ATG AAA TAC CTG CTG CCG ACC GCT GCT GCT GGT CTG CTG CTC CTC GCG 48  
 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala

1

5

10

15

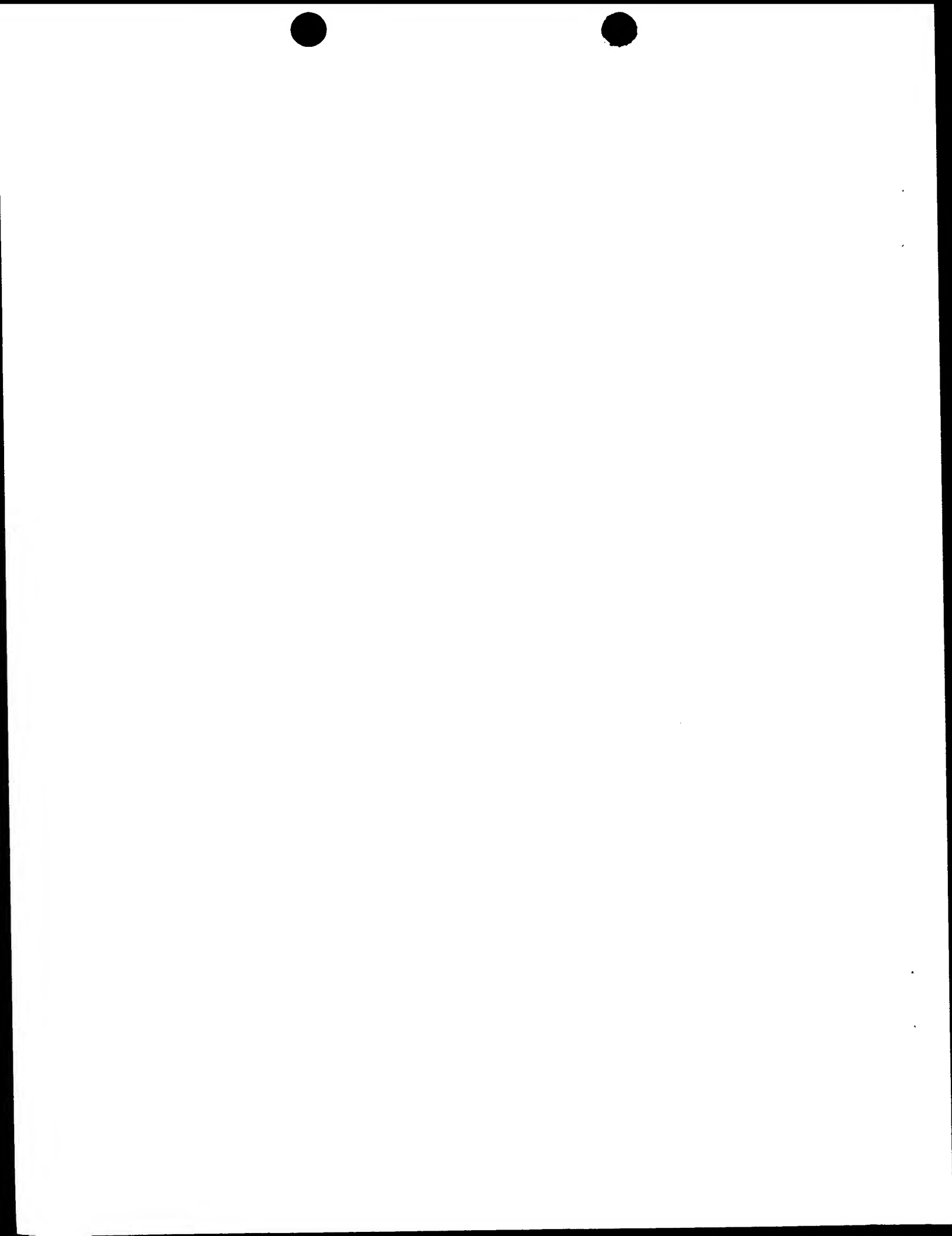
GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GGA CCT GAG 96  
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu

20

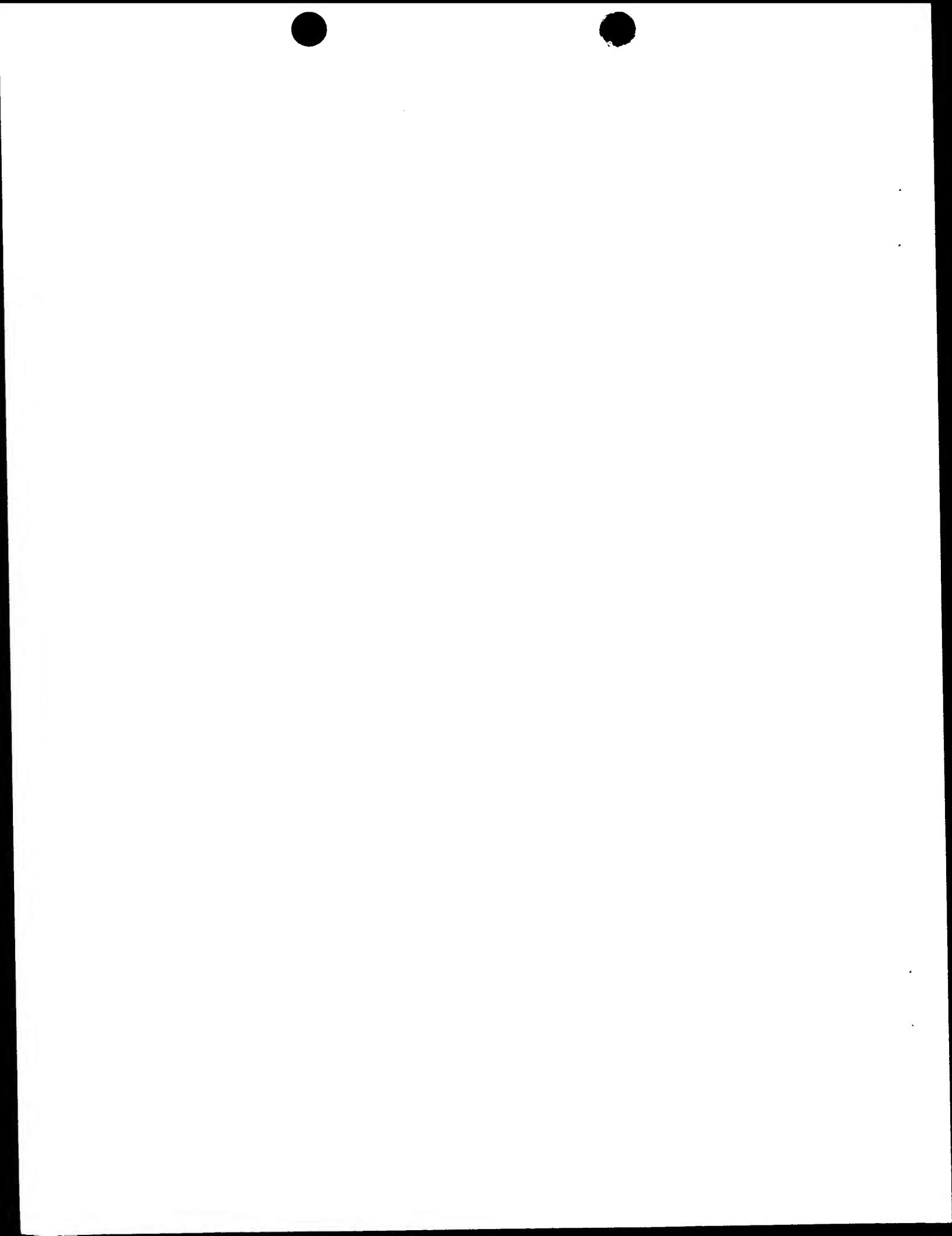
25

30

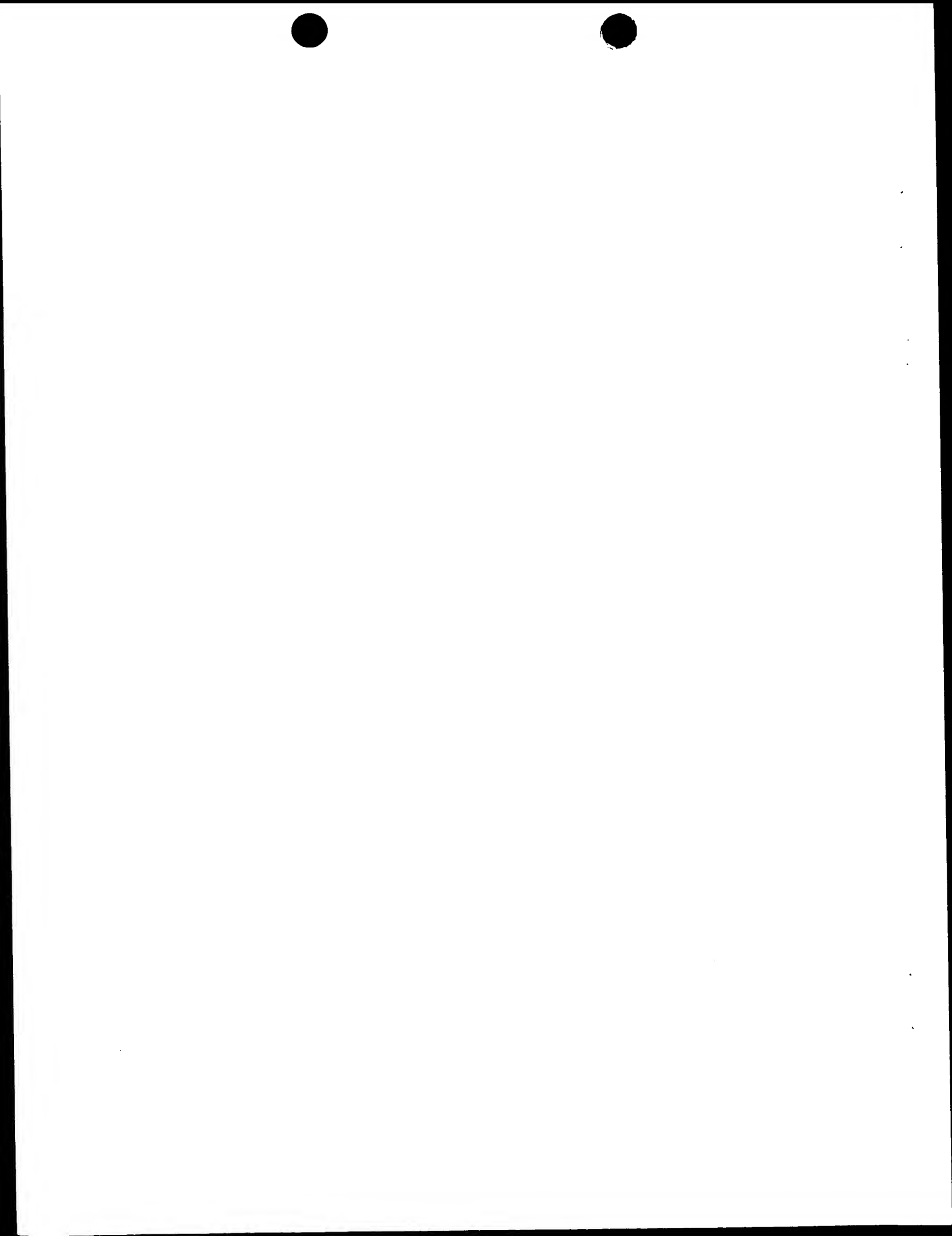
CTG GTG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGA 144



Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
 35 40 45  
 TAC ACA TTC ACT GAC TAT GTT ATA AAC TGG TTG AAC CAG AGA ACT GGA 192  
 Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Ile Asn Trp Leu Asn Gln Arg Thr Gly  
 50 55 60  
 CAG GGC CTT GAG TGG ATT GGA GAG ATT TAT CCT GGA AGT GGT AGT GCT 240  
 Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ala  
 65 70 75 80  
 TAC TAC AAT GAG ATG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA 288  
 Tyr Tyr Asn Glu Met Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys  
 85 90 95  
 TCC TCC AAC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC 336  
 Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp  
 100 105 110  
 TCT GCG GTC TAT TTC TGT GCA AGA CGC GGA ACT GGG ACG GGG TTT GCT 384  
 Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Gly Thr Gly Thr Gly Phe Ala  
 115 120 125  
 TAC TGG GGC CGA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA GGT GGA GGC GGT 432  
 Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly  
 130 135 140  
 TCA GGC GGA GGT GGC TCC GGA GGT GGC GGA TCG GAC ATT GTG CTG ACC 480  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr  
 145 150 155 160  
 CAA TCT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATC 528  
 Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile  
 165 170 175



TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG 576  
 Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met  
 180 185 190  
 AAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT 624  
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 195 200 205  
 GCT GCA TCC AAT CTA GAA TCT GGG ATC CCA GCC AGG TTT AGT GGC AGT 672  
 Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 210 215 220  
 GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG GAG 720  
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu  
 225 230 235 240  
 GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AGT GAG GAT CCT CCG ACG 768  
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Glu Asp Pro Pro Thr  
 245 250 255  
 TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA GCG GCC GCA GAC TAC AAG 816  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Ala Ala Asp Tyr Lys  
 260 265 270  
 GAT GAC GAT GAC AAA GGC TCG AGC GAG CAG AAG CTG ATC AGC GAA GAG 864  
 Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ser Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu  
 275 280 285  
 GAT CTG GGC TCG AGG TCG ACC CAC CAT CAT CAT CAC CAC GGG TCG ACC 912  
 Asp Leu Gly Ser Arg Ser Thr His His His His His His Gly Ser Thr  
 290 295 300  
 AAA TGA TAA GCT T 925  
 Lys





305

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Single strand DNA primer for PCR

&lt;400&gt; 11

AAGCTTATGA ACCGGGGAGT CCCTTTTA

28

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 56

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Single strand DNA primer for PCR

&lt;400&gt; 12

GCGGCCGCTC ACTTGTCATC GTCGTCCTTG TAGTCTGGCT GCACCGGGGT GGACCA

56

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence



<220>

<223> Single strand DNA primer for PCR

<400> 13

GGGAATTCAT GRAATGSASC TGGGTYWTYC TCTT

34

<210> 14

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Single strand DNA primer for PCR

<400> 14

CCCAAGCTTC CAGGGRCCAR KGGATARACN GRTGG

35

<210> 15

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

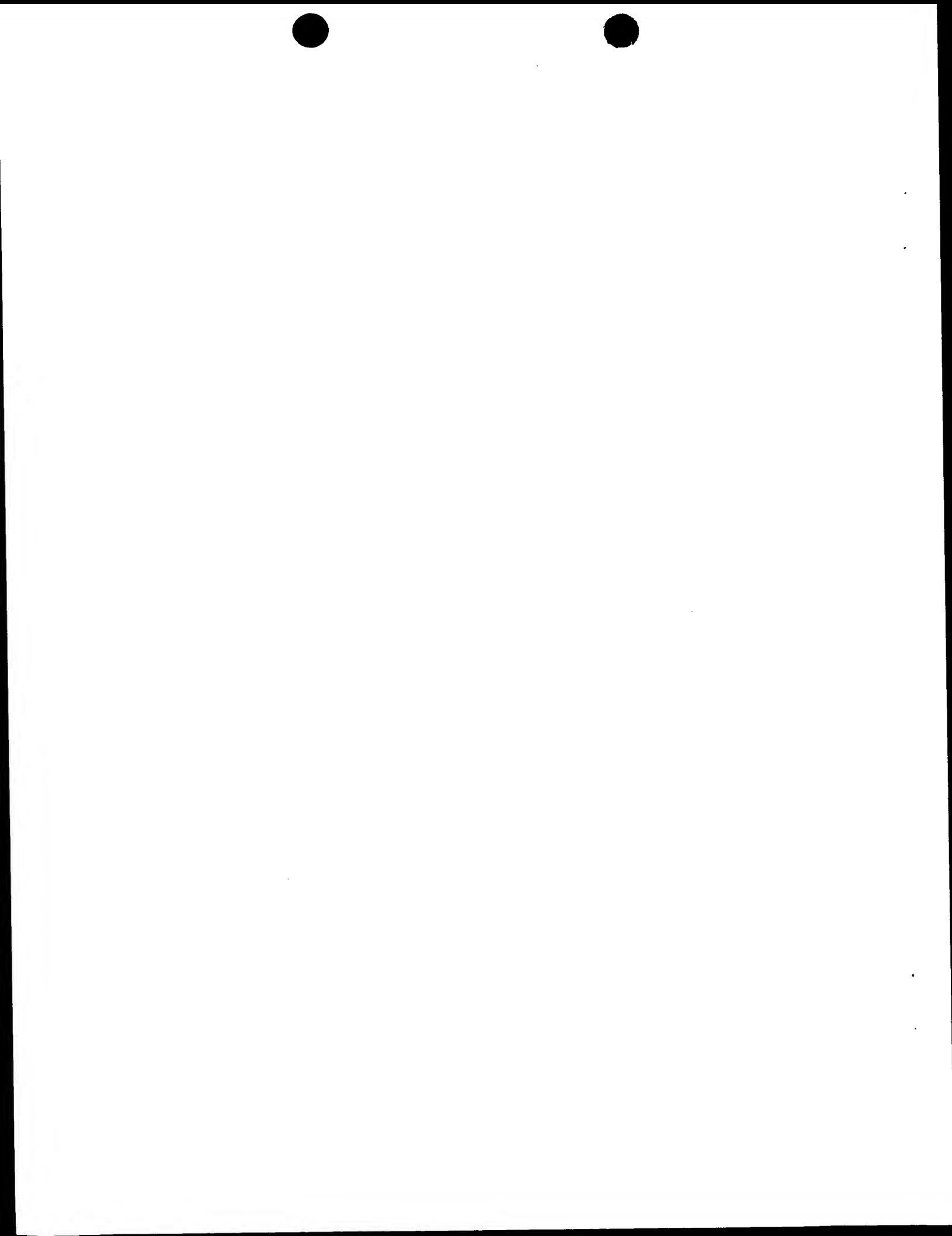
<220>

<223> Single strand DNA primer for PCR

<400> 15

TGTGCCCTCG AGCTNACNCA RAGYCCNGC

29



<210> 16  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Single strand DNA primer for PCR

<400> 16  
ATGGATACTA GTGGTGCAGC ATCAGCCC 28

<210> 17  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Single strand DNA primer for PCR

<400> 17  
GGGAATTCAT GGAGACAGAC ACACTCCTGC TAT 33

<210> 18  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Single strand DNA primer for PCR



<400> 18

CGTCGGAGGA TCCTCACTAC T

21

<210> 19

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Single strand DNA primer for PCR

<400> 19

CAGGATCCGC TGCAGCAGTC TGGACCT

27

<210> 20

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Single strand DNA primer for PCR

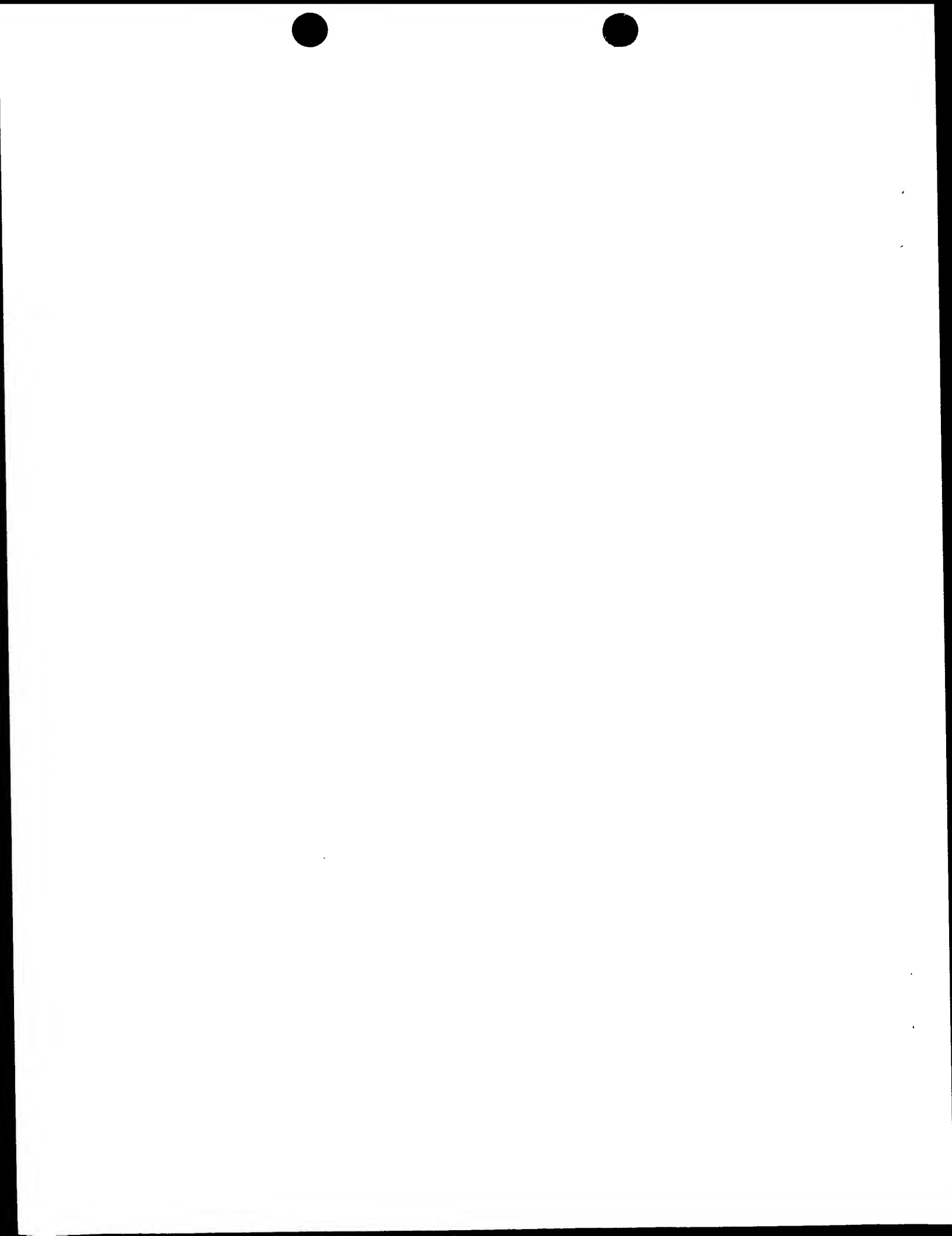
<400> 20

TGGGCCCCGTC GTTTTGGCTG CAGAGAC

27

<210> 21

<211> 56





1 5 / 3 3

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Single strand DNA primer for PCR

&lt;400&gt; 21

TCATGAAATA CCTGCTGCCG ACCGCTGCTG CTGGTCTGCT GCTCCTCGCG GCCCAG 56

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 56

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Single strand DNA primer for PCR

&lt;400&gt; 22

TGCGGCCGCA GCCATGGTGT TTGCGGCCAT CGCCGGCTGG GCCGCGAGGA GCAGCA 56

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 56

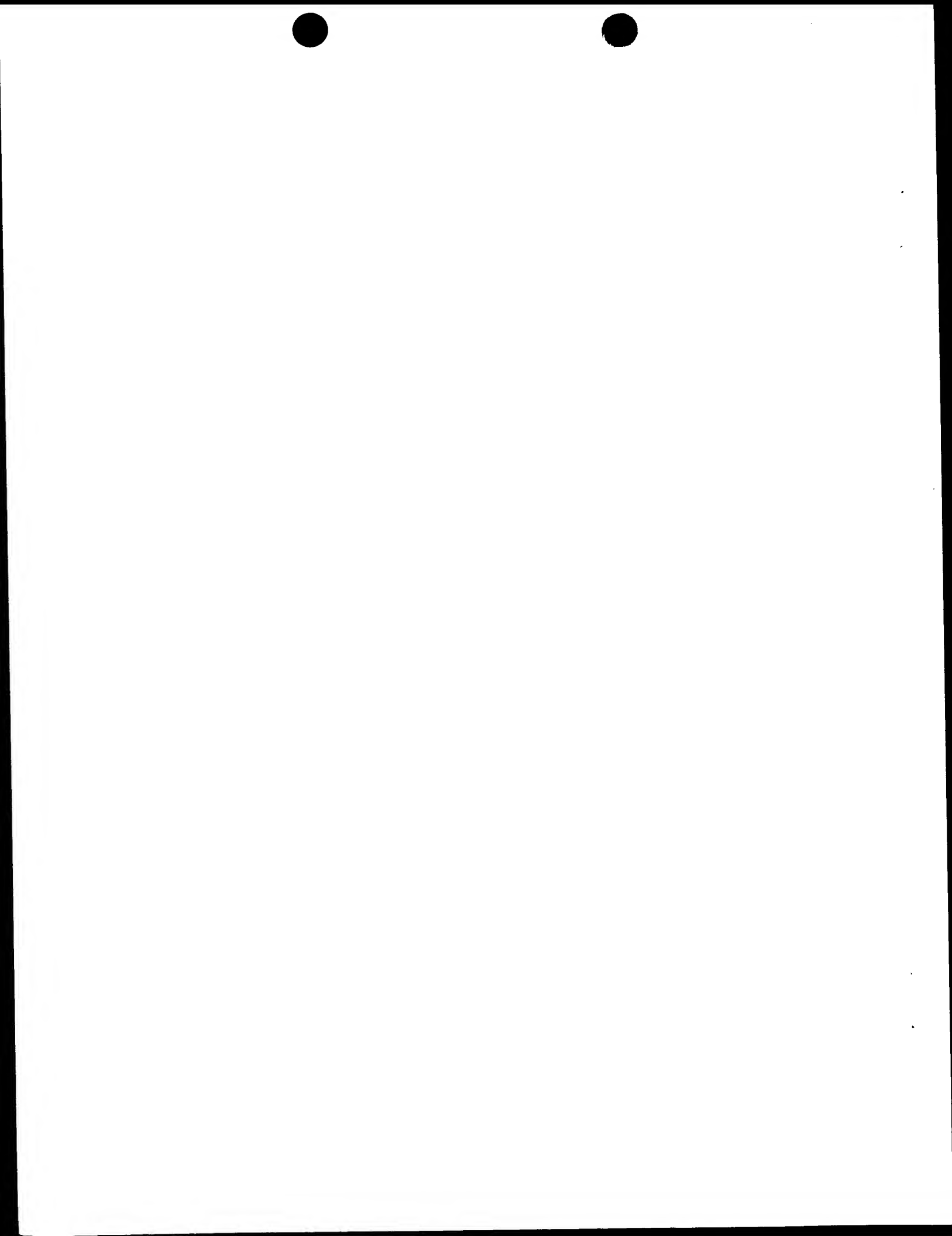
&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Single strand DNA primer for PCR

&lt;400&gt; 23



1 6 / 3 3

TGCGGCCGCA GACTACAAGG ATGACGATGA CAAAGGCTCG AGCGAGCAGA AGCTGA 56

<210> 24

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Single strand DNA primer for PCR

<400> 24

GGTGGGTCTGA CCTCGAGCCC AGATCCTCTT CGCTGATCAG CTTCTGCTCG CTCGAGC 57

<210> 25

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Single strand DNA primer for PCR

<400> 25

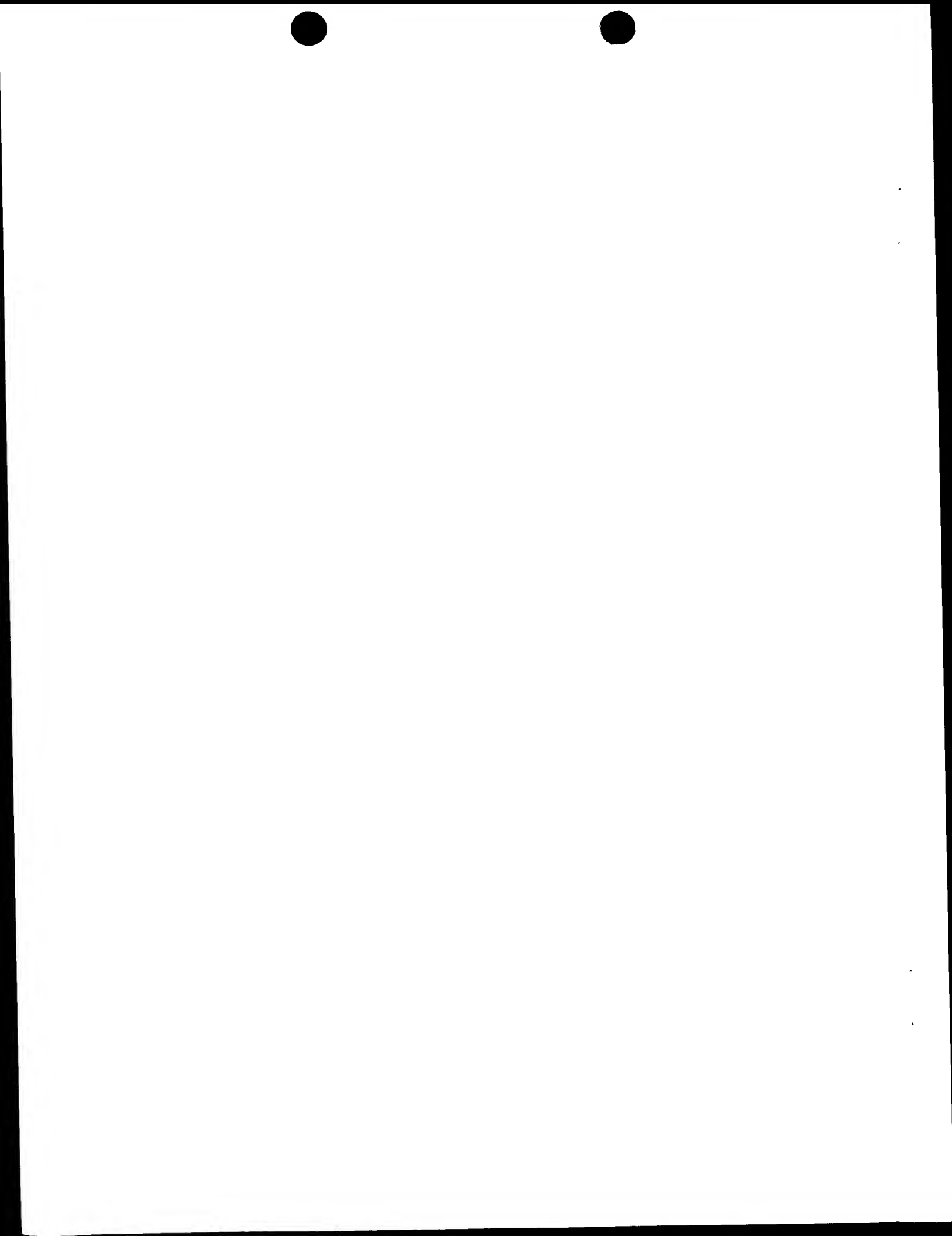
TGCGGCCGCA GACTACAAGG ATG 23

<210> 26

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



1 7 / 3 3

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Single strand DNA primer for PCR

&lt;400&gt; 26

TAAGCTTATC ATTTGGTCGA CCCGTGGTGA TGATGATGGT GGGTCGACCT CGAGCC 56

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Single strand DNA primer for PCR

&lt;400&gt; 27

AGCCGGCCAT GGCCGACATT GTGCTGACCC AATCTCCA 38

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 58

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Single strand DNA primer for PCR

&lt;400&gt; 28

CTCCGGAGCC ACCTCCGCCT GAACCGCCTC CACCTTTGAT TTCCAGCTTG GTGCCTCC 58



1 8 / 3 3

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Single strand DNA primer for PCR

&lt;400&gt; 29

CTCCGGAGGT GCGGATCGC AGGTCAGCT GCAGCAGTCT

40

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Single strand DNA primer for PCR

&lt;400&gt; 30

TGCGGCCGCT GCAGAGACAG TGACCAGAGT C

31

&lt;210&gt; 31

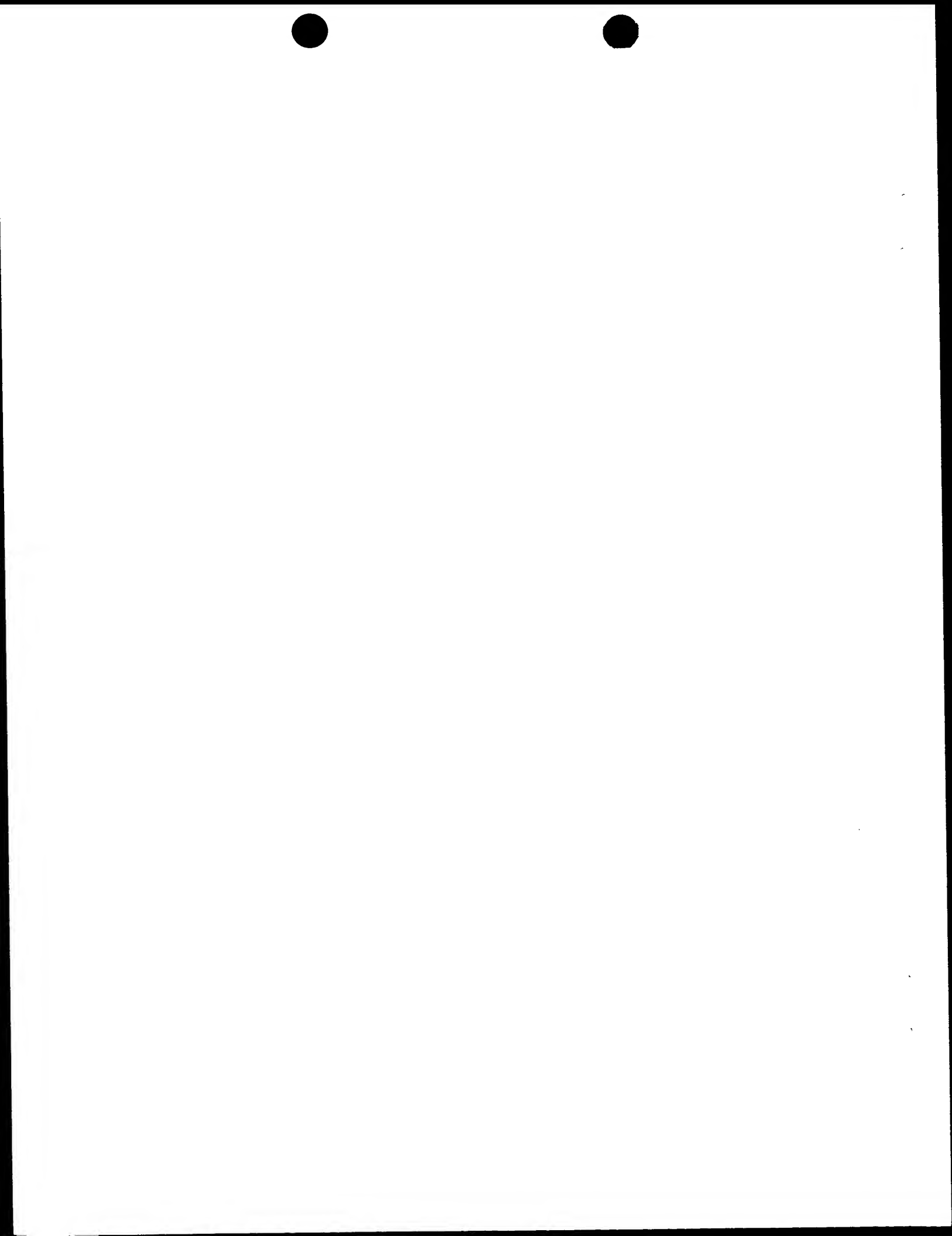
&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Single strand DNA primer for PCR





1 9 / 3 3

&lt;400&gt; 31

AGCCGGCCAT GGCCCAGGTT CAGCTGCAGC AGTCT

35

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 56

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Single strand DNA primer for PCR

&lt;400&gt; 32

CTCCGGAGCC ACCTCCGCCT GAACCGCCTC CACCTGCAGA GACAGTGACC AGAGTC

56

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 43

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Single strand DNA primer for PCR

&lt;400&gt; 33

CTCCGGAGGT GGCGGATCGG ACATTGTGCT GACCCAATCT CCA

43

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 33



2 0 / 3 3

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Single strand DNA primer for PCR

&lt;400&gt; 34

TGC GGC CGCT TTGATTCCA GCTTGGTGCC TCC

33

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; mouse

&lt;400&gt; 35

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Val Ile Asn Trp Leu Asn Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ala Tyr Tyr Asn Glu Met Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95



2 1 / 3 3

Ala Arg Arg Gly Thr Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Arg Gly Thr

100

105

110

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; mouse

&lt;400&gt; 36

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1

5

10

15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp

20

25

30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35

40

45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50

55

60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His

65

70

75

80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser

85

90

95

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

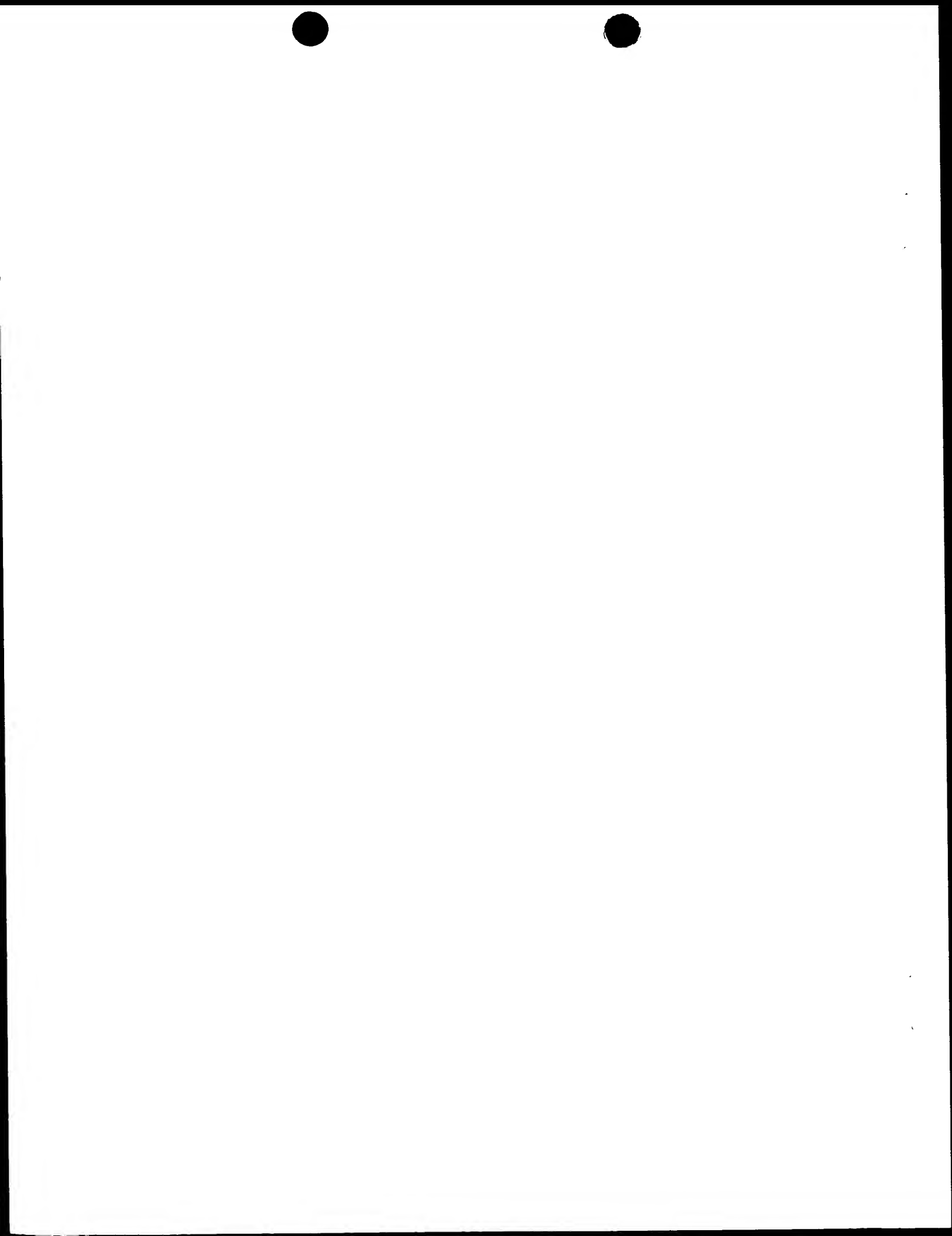
110



<210> 37  
 <211> 354  
 <212> DNA  
 <213> mouse

<400> 37

CAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCT	48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
TCA GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACA TTC ACT GAC TAT	96
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr	
20 25 30	
GTT ATA AAC TGG TTG AAC CAG AGA ACT GGA CAG GGC CTT GAG TGG ATT	144
Val Ile Asn Trp Leu Asn Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
GGA GAG ATT TAT CCT GGA AGT GGT AGT GCT TAC TAC AAT GAG ATG TTC	192
Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ala Tyr Tyr Asn Glu Met Phe	
50 55 60	
AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AAC ACA GCC TAC	240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TTC TGT	288
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys	
85 90 95	
GCA AGA CGC GGA ACT GGG ACG GGG TTT GCT TAC TGG GGC CGA GGG ACT	336
Ala Arg Arg Gly Thr Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Arg Gly Thr	





2 3 / 3 3

100 105 110 354

CTG GTC ACT GTC TCT GCA  
Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 38  
<211> 333  
<212> DNA  
<213> mouse

&lt;400&gt; 38

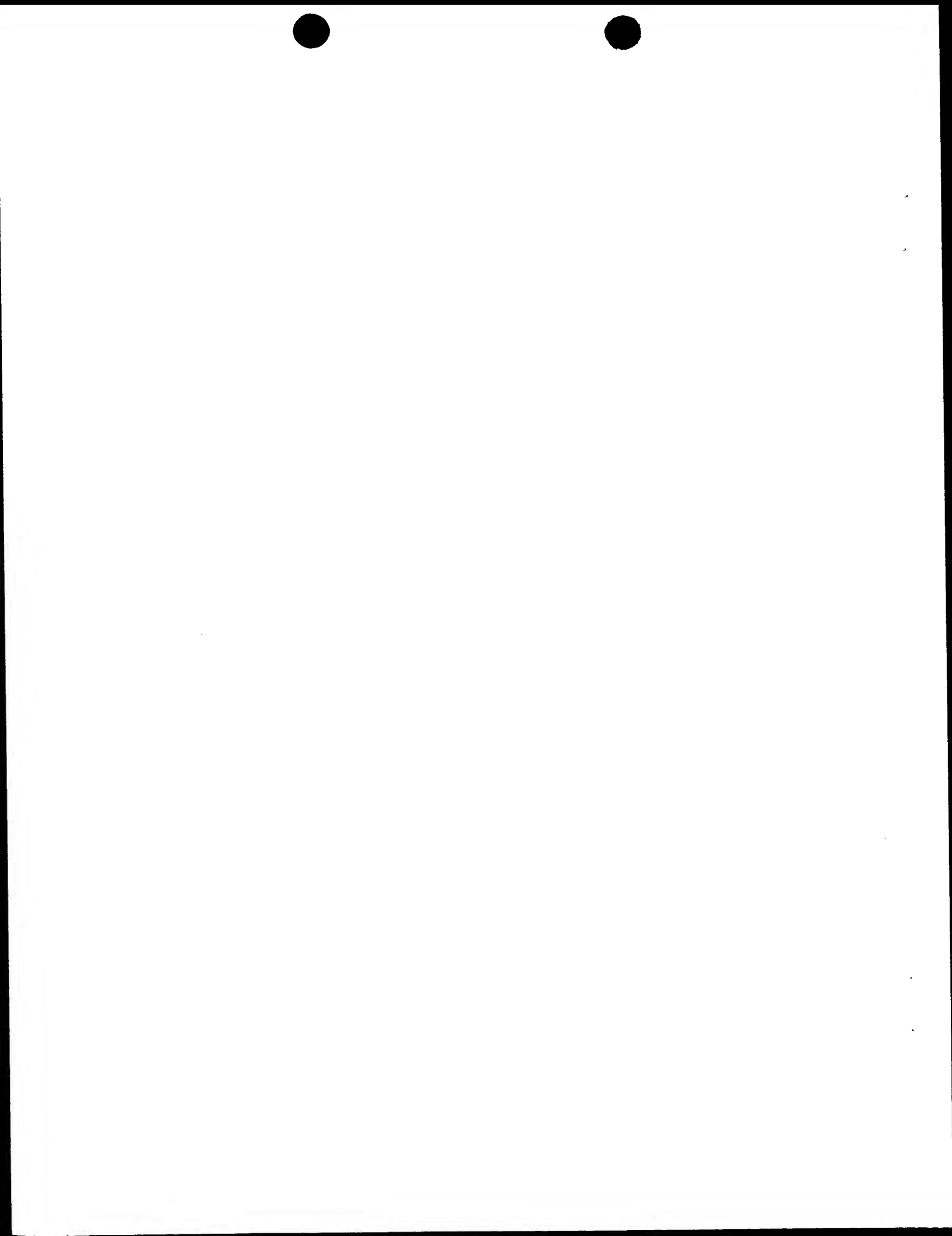
GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG 48  
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15

CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT 96  
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp  
20 25 30

GGT GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC 144  
Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

AAA CTC CTC ATC TAT GCT GCA TCC AAT CTA GAA TCT GGG ATC CCA GCC 192  
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala  
50 55 60

AGG TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC AAC ATC CAT 240  
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His  
65 70 75 80



2 4 / 3 3

CCT GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AGT 288  
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser

85

90

95

GAG GAT CCT CCG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA 333  
 Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 351

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; mouse

&lt;400&gt; 39

CAG GTG CAG CTG AAG CAG TCA GGA CCT GGC CTA GTG CAG CCC TCA CAG 48  
 Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln

5

10

15

AGC CTG TCC TTC ATC TGC ACA GTC TCT GGT TTC TCA TTA ACT AGT CAT 96  
 Ser Leu Ser Phe Ile Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser His

20

25

30

GGT GTA CAC TGG GTT CGC CAG TCT CCA GGA AAG GGT CTG GAG TGG CTG 144  
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35

40

45

GGA GTG ATA TGG GGT GCT GGA AGG ACA GAC TAT AAT GCA GCT TTC ATA 192  
 Gly Val Ile Trp Gly Ala Gly Arg Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile

50

55

60

TCC AGA CTG AGC ATC AGC AGG GAC ATT TCC AAG AGC CAA GTT TTC TTT 240  
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Ile Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe



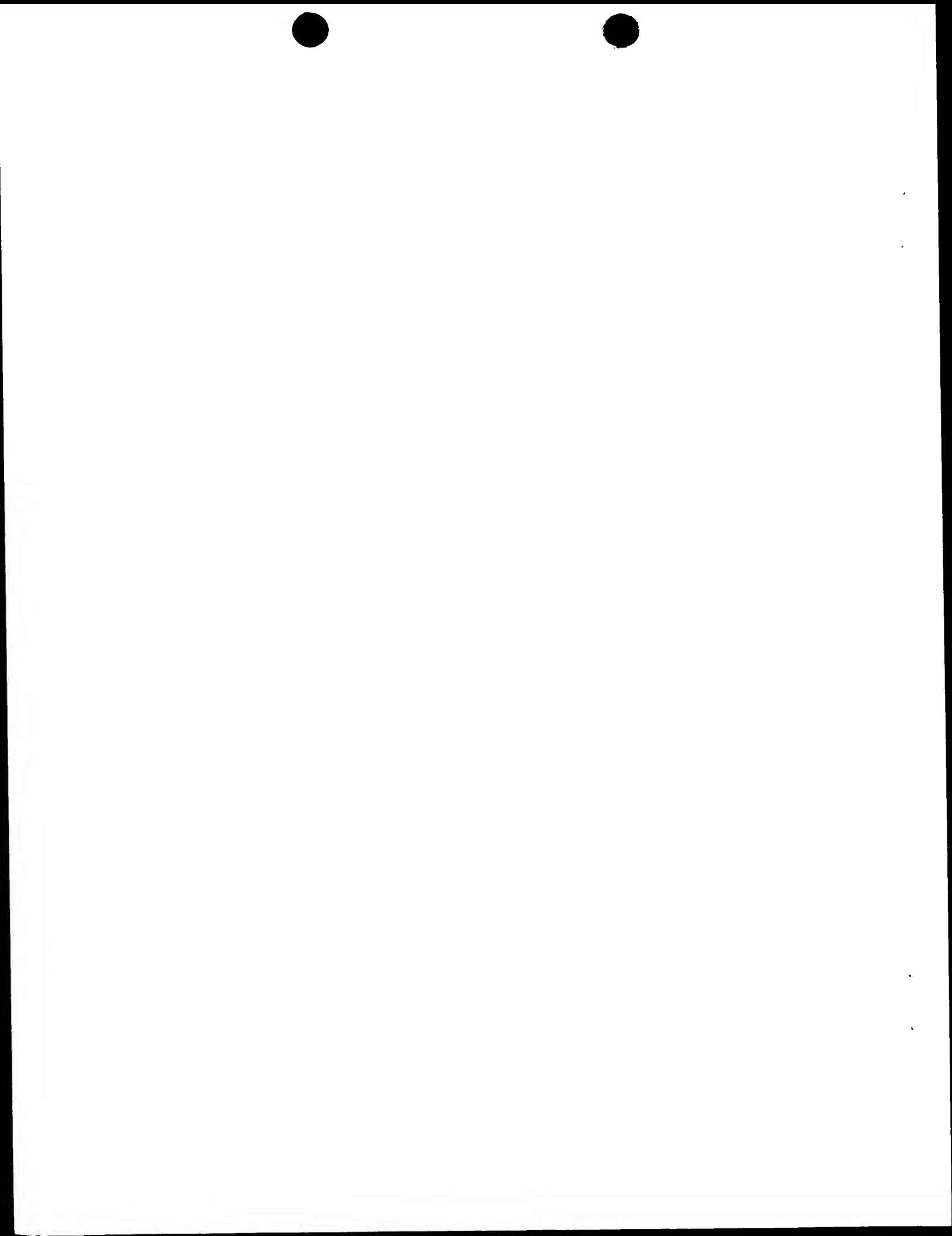
2 5 / 3 3

65	70	75	80	
AAG ATG AAC AGT CTG CAA GTT GAT GAC ACA GCC ATA TAT TAC TGT GCC	288			
Lys Met Asn Ser Leu Gln Val Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala				
85	90	95		
AGA AAT AGG TAC GAG AGC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT	336			
Arg Asn Arg Tyr Glu Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr				
100	105	110		
TCC CTC ACA GTC TCC			351	
Leu Thr Val Ser Ser				

115

<210> 40  
 <211> 339  
 <212> DNA  
 <213> mouse

<400> 40	
GAT GTT GTG ATG ACC CAA ACT CCA CTC TCC CTG CCT GTC AGT CTT GGA	48
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly	
5	10
GAT CAG GCC TCC ATC TCT TGC AGA TCT AGT CAG AAC CTT GTA CAC AGT	96
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Leu Val His Ser	
20	25
AAT GGA AAT ACC TAT TTA CAT TGG TAC CTG CAG AAG CCA GGC CAG TCT	144
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	
35	40
	45



2 6 / 3 3

CCA AAT CTC CTG ATC TAC AAA GTT TCC AAC CGA TTT TCT GGG GTC CCA 192  
 Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
           50                          55                          60

GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAA TTC ACA CTC AAG ATC 240  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Lys Ile  
           65                          70                          75                          80

AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT CTG GGA GTT TAT TTC TGC TCT CAA AGT 288  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
                                   85                          90                          95

ACA CAT GTT CCG CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG GTG GAG CTG AAA 336  
 Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys  
                           100                          105                          110

CGG 339  
 Arg

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 879

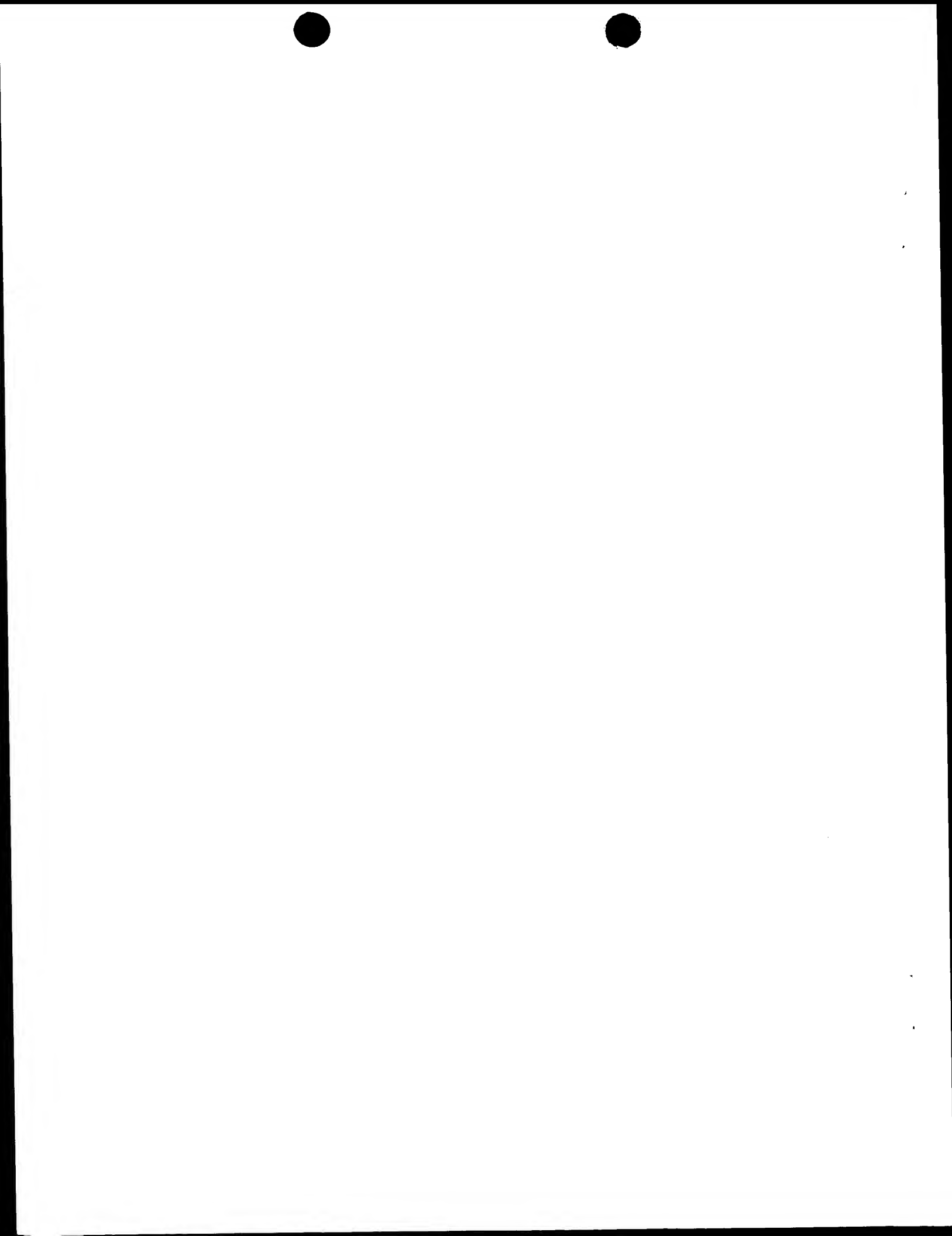
&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; mouse

&lt;400&gt; 41

ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTT GGA GCC TTT TTT TTG GAG ATT TTC 48  
 Met Thr Met Ile Thr Pro Ser Phe Gly Ala Phe Phe Leu Glu Ile Phe  
                           5                          10                          15

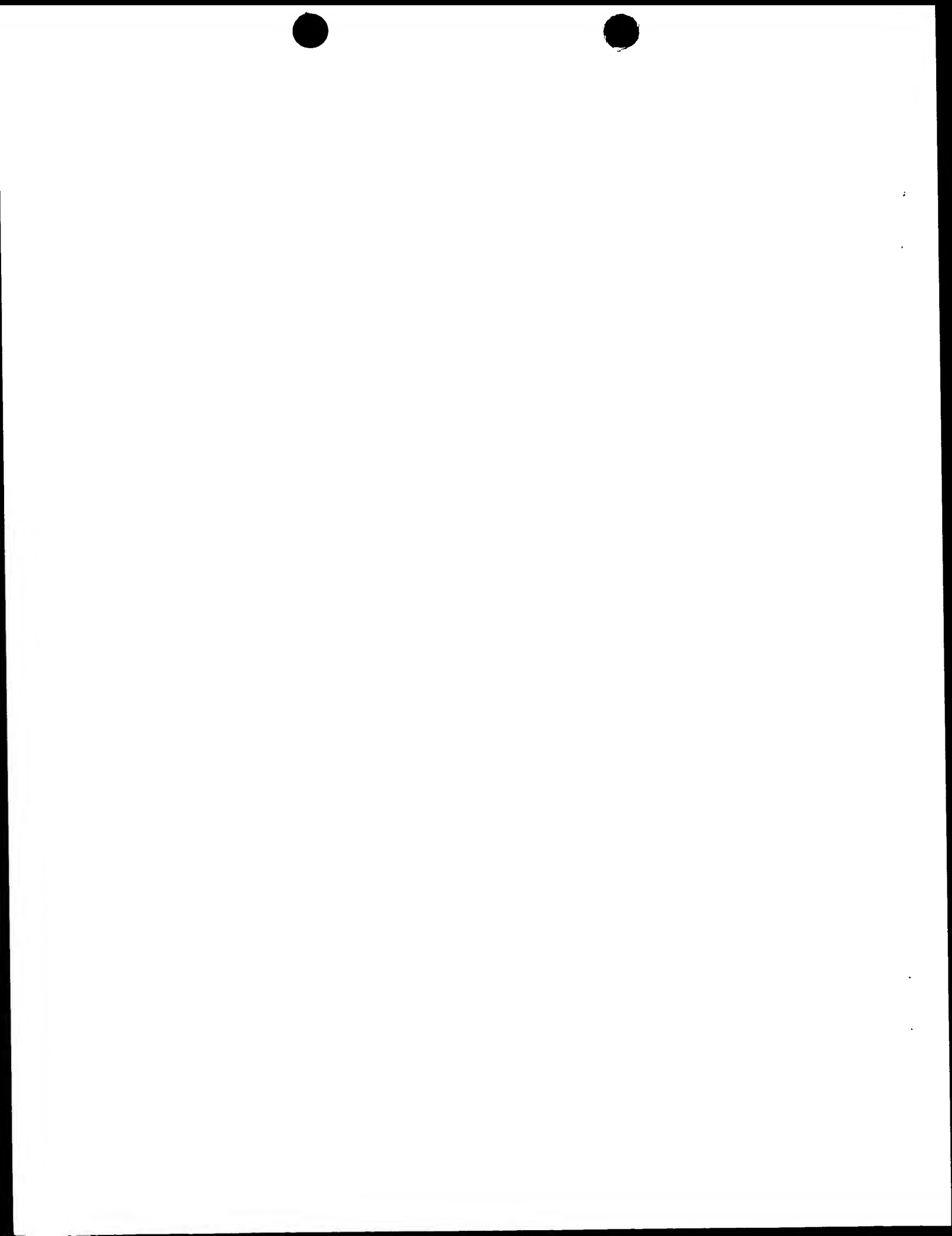
AAC GTG AAA AAA TTA TTA TTC GCA ATT CCT TTA GTT GTT CCT TTC TAT 96  
 Asn Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr





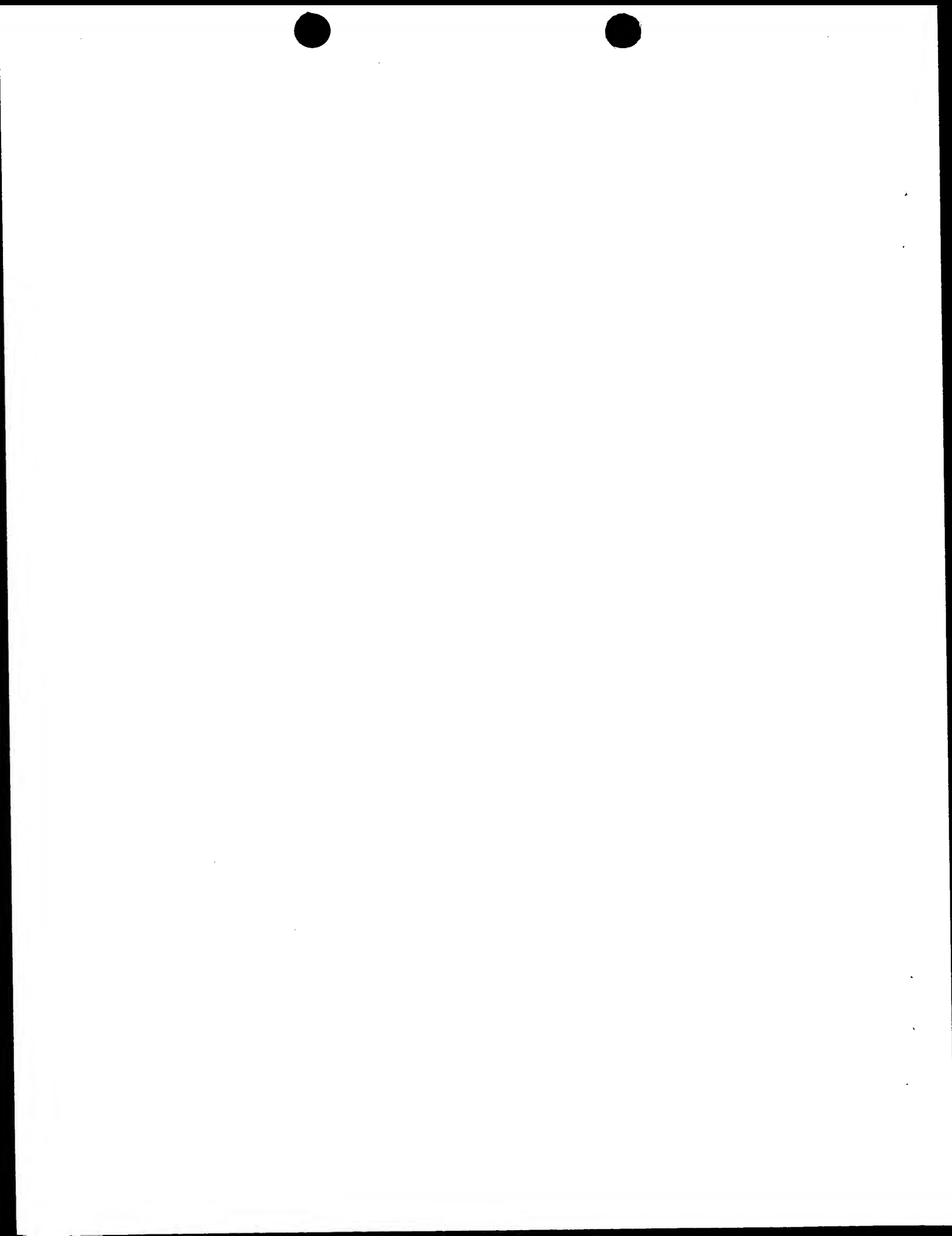
2 7 / 3 3

20	25	30	
GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG AAG CTG CAG CAG TCT GGA CCT			144
Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro			
35	40	45	
GGC CTA GTG CAG CCC TCA CAG AGC CTG TCC TTC ATC TGC ACA GTC TCT			192
Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Phe Ile Cys Thr Val Ser			
50	55	60	
GGT TTC TCA TTA ACT AGT CAT GGT GTA CAC TGG GTT CGC CAG TCT CCA			240
Gly Phe Ser Leu Thr Ser His Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro			
65	70	75	80
GGA AAG GGT CTG GAG TGG CTG GGA GTG ATA TGG GGT GCT GGA AGG ACA			288
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ala Gly Arg Thr			
85	90	95	
GAC TAT AAT GCA GCT TTC ATA TCC AGA CTG AGC ATC AGC AGG GAC ATT			336
Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Ile			
100	105	110	
TCC AAG AGC CAA GTT TTC TTT AAG ATG AAC AGT CTG CAA GTT GAT GAC			384
Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Val Asp Asp			
115	120	125	
ACA GCC ATA TAT TAC TGT GCC AGA AAT AGG TAC GAG AGC TAC TTT GAC			432
Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Tyr Glu Ser Tyr Phe Asp			
130	135	140	
TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT			480
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly			
145	150	155	160
TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATC GAG CTC ACT			528



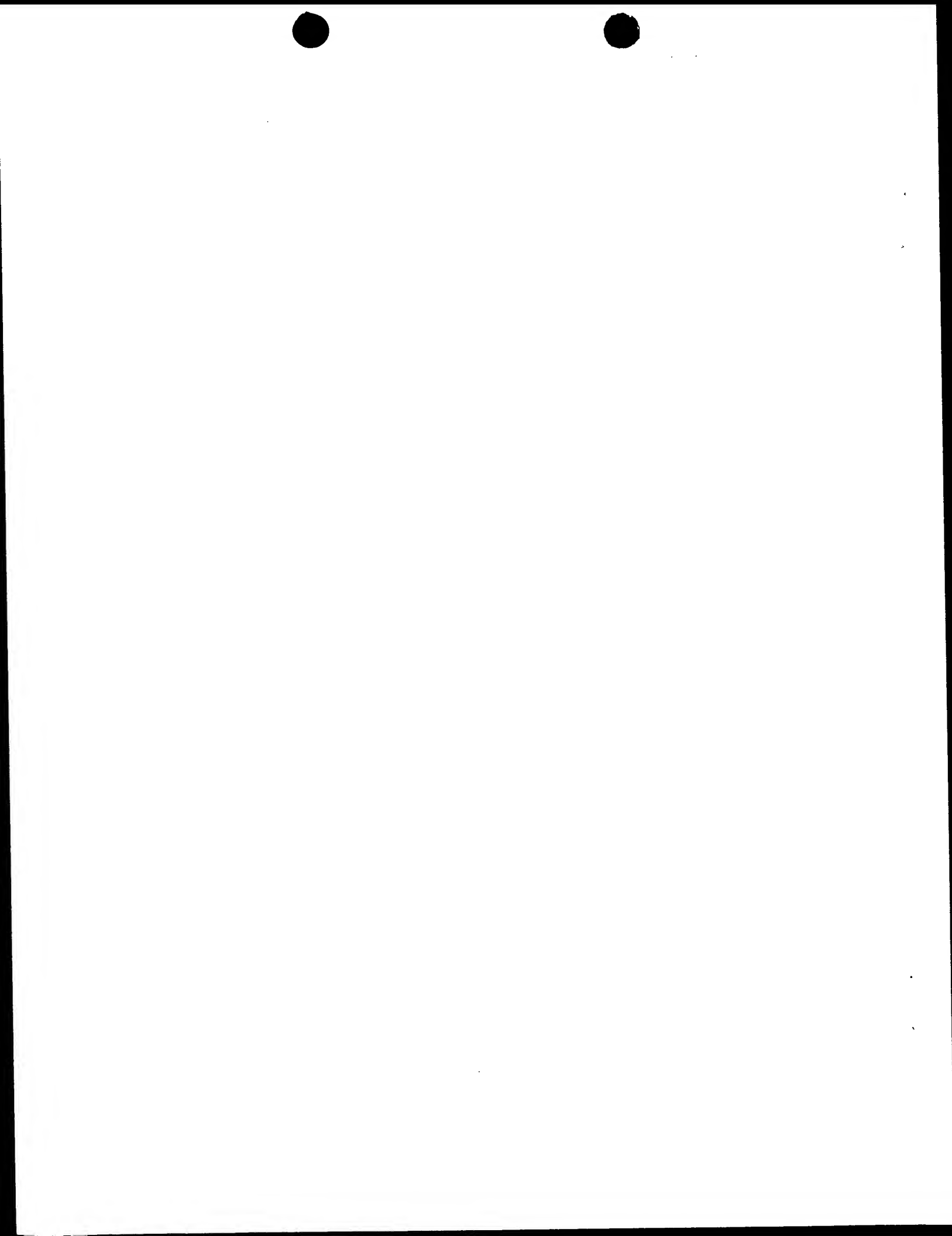
2 8 / 3 3

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr  
 165 170 175  
 CAG TCT CCA CTC TCC CTG CCT GTC AGT CTT GGA GAT CAG GCC TCC ATC 576  
 Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile  
 180 185 190  
 TCT TGC AGA TCT AGT CAG AAC CTT GTA CAC AGT AAT GGA AAT ACC TAT 624  
 Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr  
 195 200 205  
 TTA CAT TGG TAC CTG CAG AAG CCA GGC CAG TCT CCA AAT CTC CTG ATC 672  
 Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Asn Leu Leu Ile  
 210 215 220  
 TAC AAA GTT TCC AAC CGA TTT TCT GGG GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC 720  
 Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
 225 230 235 240  
 AGT GGA TCA GGG ACA GAA TTC ACA CTC AAG ATC AGC AGA GTG GAG GCT 768  
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala  
 245 250 255  
 GAG GAT CTG GGA GTT TAT TTC TGC TCT CAA AGT ACA CAT GTT CCG CTC 816  
 Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Leu  
 260 265 270  
 ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG GTG GAG CTG AAA CGG GCG GCC GCA GGT 864  
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys Arg Ala Ala Ala Gly  
 275 280 285  
 GCG CCG GTG CCG TAT CCG GAT CCG CTG GAA CCG CGT GCC GCA TAG 909  
 Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Ala Ala  
 290 295 300



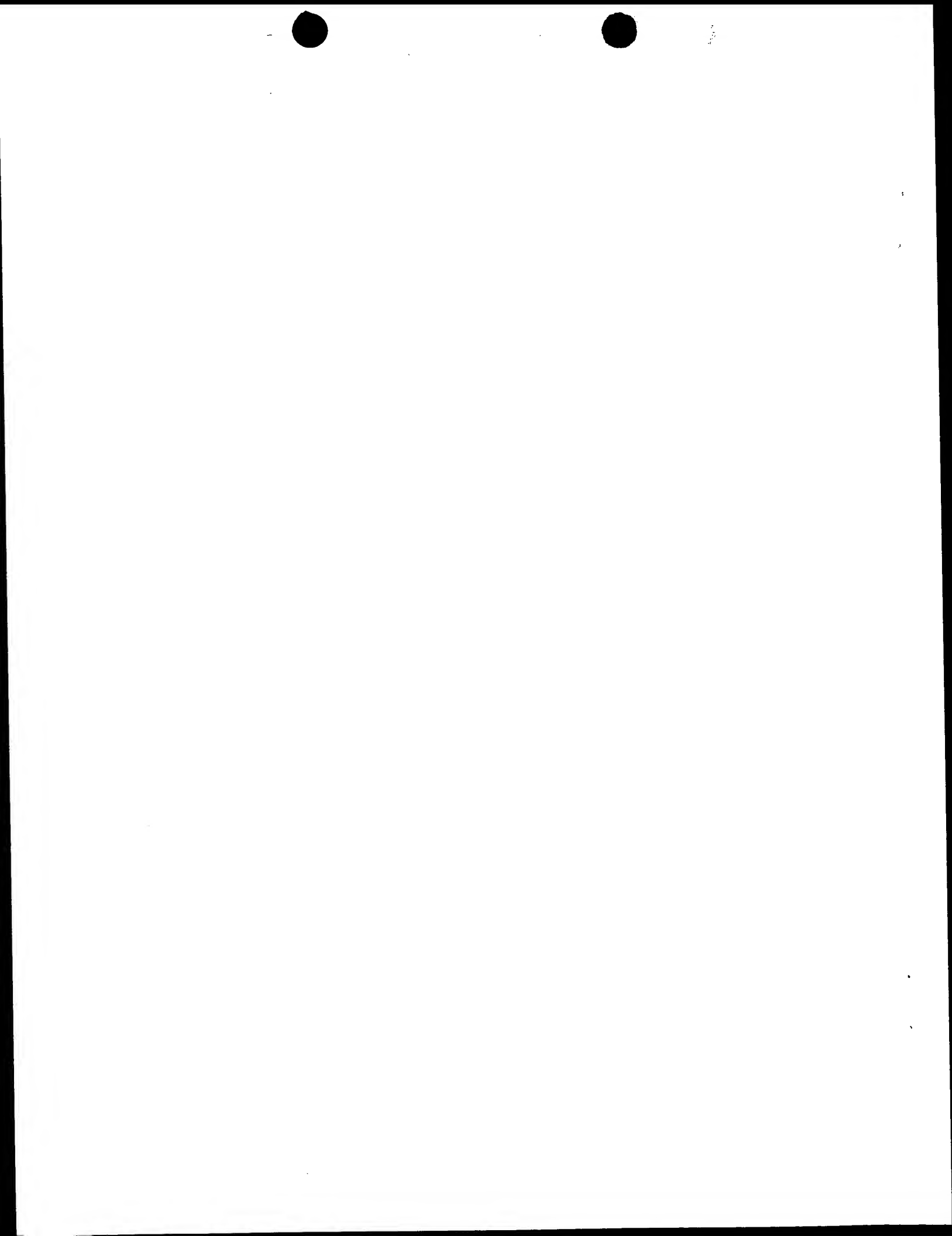
<210> 42  
 <211> 918  
 <212> DNA  
 <213> mouse

<400> 42  
 ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTT GGA GCC TTT TTT TTG GAG ATT TTC 48  
 Met Thr Met Ile Thr Pro Ser Phe Gly Ala Phe Phe Leu Glu Ile Phe  
 5 10 15  
 AAC GTG AAA AAA TTA TTA TTC GCA ATT CCT TTA GTT GTT CCT TTC TAT 96  
 Asn Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr  
 20 25 30  
 GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG AAG CTG CAG CAG TCT GGA CCT 144  
 Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro  
 35 40 45  
 GGC CTA GTG CAG CCC TCA CAG AGC CTG TCC TTC ATC TGC ACA GTC TCT 192  
 Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Phe Ile Cys Thr Val Ser  
 50 55 60  
 GGT TTC TCA TTA ACT AGT CAT GGT GTA CAC TGG GTT CGC CAG TCT CCA 240  
 Gly Phe Ser Leu Thr Ser His Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro  
 65 70 75 80  
 GGA AAG GGT CTG GAG TGG CTG GGA GTG ATA TGG GGT GCT GGA AGG ACA 288  
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ala Gly Arg Thr  
 85 90 95  
 GAC TAT AAT GCA GCT TTC ATA TCC AGA CTG AGC ATC AGC AGG GAC ATT 336



3 0 / 3 3

Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Ile  
 100 105 110  
 TCC AAG AGC CAA GTT TTC TTT AAG ATG AAC AGT CTG CAA GTT GAT GAC 384  
 Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Val Asp Asp  
 115 120 125  
 ACA GCC ATA TAT TAC TGT GCC AGA AAT AGG TAC GAG AGC TAC TTT GAC 432  
 Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Tyr Glu Ser Tyr Phe Asp  
 130 135 140  
 TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT 480  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly  
 145 150 155 160  
 TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATC GAG CTC ACT 528  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr  
 165 170 175  
 CAG TCT CCA CTC TCC CTG CCT GTC AGT CTT GGA GAT CAG GCC TCC ATC 576  
 Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile  
 180 185 190  
 TCT TGC AGA TCT AGT CAG AAC CTT GTA CAC AGT AAT GGA AAT ACC TAT 624  
 Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr  
 195 200 205  
 TTA CAT TGG TAC CTG CAG AAG CCA GGC CAG TCT CCA AAT CTC CTG ATC 672  
 Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Asn Leu Leu Ile  
 210 215 220  
 TAC AAA GTT TCC AAC CGA TTT TCT GGG GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC 720  
 Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
 225 230 235 240





3 1 / 3 3

AGT GGA TCA GGG ACA GAA TTC ACA CTC AAG ATC AGC AGA GTG GAG GCT 768  
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala  
                     245                    250                    255  
 GAG GAT CTG GGA GTT TAT TTC TGC TCT CAA AGT ACA CAT GTT CCG CTC 816  
 Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Leu  
                     260                    265                    270  
 ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG GTG GAG CTG AAA CGG GCG GCC GCA GGT 864  
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys Arg Ala Ala Ala Gly  
                     275                    280                    285  
 GCG CCG GTG CCG TAT CCG GAT CCG CTG GAA CCG CGT GCC GCA AAG 909  
 Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Ala Ala Lys  
                     290                    295                    300  
 AAG AAG TAG 918  
 Lys Lys  
                     305

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

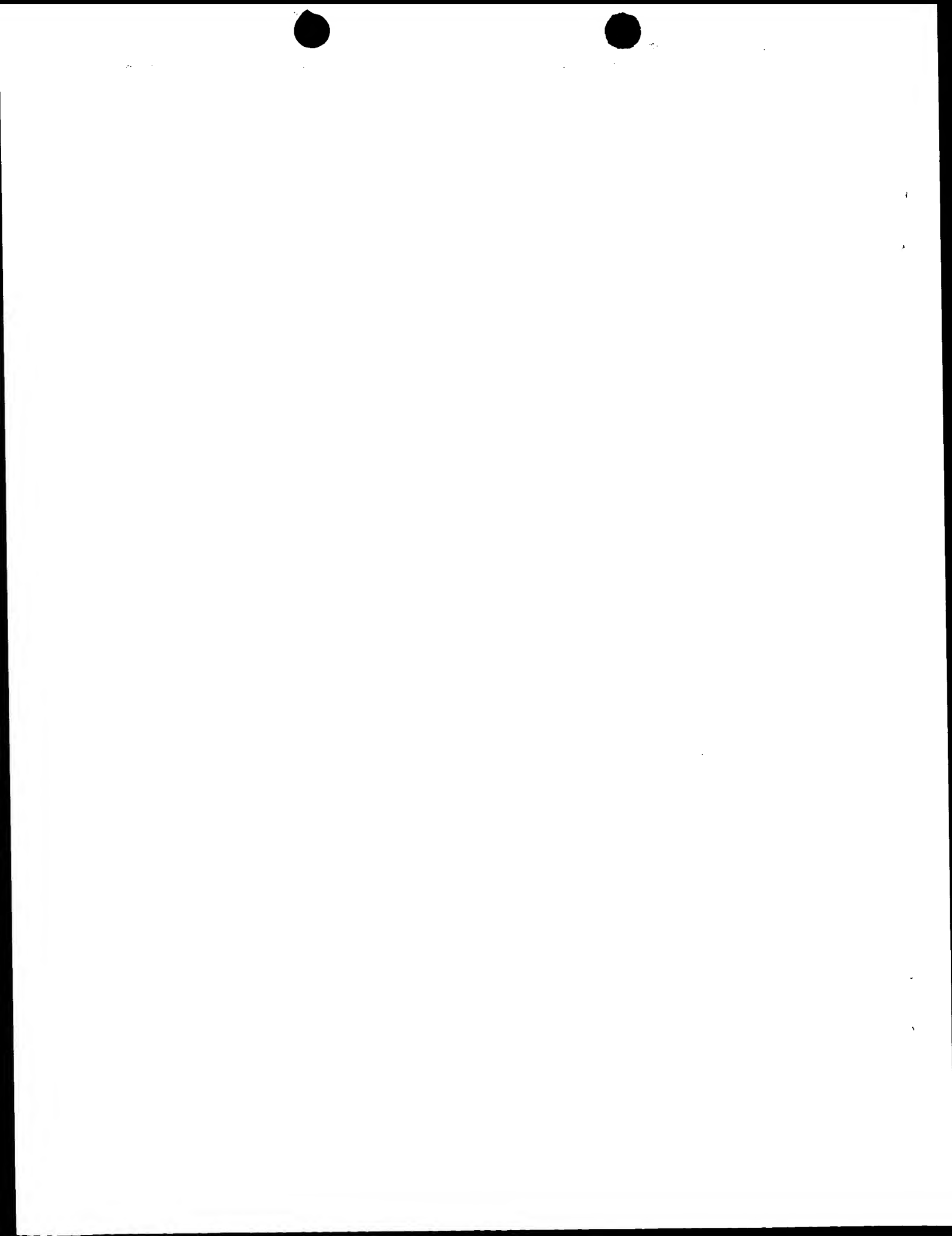
&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Amino acid sequence of heavy chain CDR-1

&lt;400&gt; 43

Ser His Gly Val His



3 2 / 3 3

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Amino acid sequence of heavy chain CDR-2

&lt;400&gt; 44

Val Ile Trp Gly Ala Gly Arg Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser

1

5

10

15

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Amino acid sequence of heavy chain CDR-3

&lt;400&gt; 45

Asn Arg Tyr Glu Ser Tyr Phe Asp Tyr

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;



3 3 / 3 3

<223> Amino acid sequence of light chain CDR-1

<400> 46

Arg Ser Ser Gln Asn Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 47

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of light chain CDR-2

<400> 47

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of light chain CDR-3

<400> 48

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02711

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/62, C12N15/13, C07K16/28, C07K16/46, C12P21/08, C12N5/12, C12M1/00, G01N33/53, A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/62, C12N15/13, C07K16/28, C07K16/46, C12P21/08, C12N5/12, C12M1/00, G01N33/53, A61K39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
SwissProt/PIR/GeneSeq, CA (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	JP, 10-155489, A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 16 June, 1998 (16. 06. 98) (Family: none)	1, 5-10, 14-17
Y	JP, 10-70986, A (BML, Inc.), 17 March, 1998 (17. 03. 98) (Family: none)	1-4, 8-13, 17-28
Y	WEISSENHORN, W et al., "Combinatorial functions of two chimeric antibodies directed to human CD4 and one directed to the $\alpha$ -chain of the human interleukin-2 receptor", Gene (1992) Vol. 121, No. 2 p.271-278	1-28
Y	DONAHUE, R.E et al., "Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer", J. of Experimental Medicine (1992) Vol. 176, No. 4 p.1125-1135	5-7, 14-16
Y	JP, 2-238883, A (Becton, Dickinson and Co.), 21 September, 1990 (21. 09. 90) & EP, 365209, A	1-4, 8-13, 17-28

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search  
9 August, 1999 (09. 08. 99)

Date of mailing of the international search report  
31 August, 1999 (31. 08. 99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP99/02711

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 6-125783, A (Juridical Foundation The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute), 10 May, 1994 (10. 05. 94) (Family: none)	1-4, 8-13, 17-28



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C12N 15/62, C12N 15/13, C07K 16/28, C07K 16/46,  
C12P 21/08, C12N 5/12, C12M 1/00, G01N 33/53,  
A61K 39/395

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C12N 15/62, C12N 15/13, C07K 16/28, C07K 16/46,  
C12P 21/08, C12N 5/12, C12M 1/00, G01N 33/53,  
A61K 39/395

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, CA(STN), REGISTRY(STN),  
WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	JP, 10-155489, A (旭化成工業株式会社 他) 16.6月.1998 (16.06.98) パテントファミリーなし	1, 5-10, 14-17
Y	JP, 10-70986, A (株式会社ピー・エム・エル) 17.3月.1998 (17.03.98) パテントファミリーなし	1-4, 8-13, 17-28

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.08.99

国際調査報告の発送日

31.08.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

印

4B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WEISSENHORN, W et al. "Combinatorial functions of two chimeric antibodies directed to human CD4 and one directed to the $\alpha$ -chain of the human interleukin-2 receptor", Gene (1992) 第121巻, 第2号 p. 271-278	1-28
Y	DONAHUE, R. E et al. "Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer", J. of Experimental Medicine(1992) 第176巻, 第4号 p. 1125-1135	5-7; 14-16
Y	JP, 2-238883, A (ベクトン・デイツキンソン・アンド・カンパニー) 21.9月. 1990 (21.09.90) & EP, 365209, A	1-4, 8-13, 17-28
A	JP, 6-125783, A (財団法人化学及血清療法研究所) 10.5月. 1994 (10.05.94) パテントファミリーなし	1-4, 8-13, 17-28